Beiträge zur Kenntnis des Glutokyrin-β-sulfates.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Philosophischen Fakultät der Universität Leipzig

vorgelegt von

Walter Schunke
aus Halle (Saale).

ACAD.
LUGD.BAT.
BIBL.

Halle (Saale)
Druck von Heinrich John
1916.

Angenommen von der III. Sektion auf Grund der Gutachten der Herren

Paal und Hantzsch.

Leipzig, den 6. März 1916.

Der Prokanzellar.
G. Herglotz.

Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit.

Nachstehende Arbeit wurde in der chemischen Abteilung des Physiologischen Instituts der Universität Leipzig ausgeführt.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, meinem hochverehrten Lehrer

Herrn Professor Dr. M. Siegfried

für die Anregung zu dieser Arbeit, ebenso wie für die mir stets zuteil gewordene Unterstützung und das mir in reichem Maße bewiesene Wohlwollen auch an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Inhaltsübersicht.

Seite

Einleitung 9
A. Aufgabe der Arbeit 11
B. Eigene Untersuchungen 12
I. Teil:
Untersuchungen des Glutokyrin-β-sulfates 12
1. Darstellung des Glutokyrin-β-sulfates 12
2. Prinzip der auf das Glutokyrin-β-sulfat angewandten Methoden 14
a) Die Carbamino-Reaktion nach Siegfried . . . 15
b) Die Formoltitrierung nach Sörensen 15
c) Die Bestimmung der aliphatischen Aminogruppen nach van Slyke 17
d) Die Naphtalinsulfochloridmethode nach Fischer und Bergell. Der „Azylquotient“ 18
3. Bestimmung der Konstanten des Glutokyrin-β-sulfates 19
4. Totale Hydrolyse des Glutokyrin-β-sulfates und Bestimmung der Konstanten in der Summe der Spaltungsprodukte 22
5. Diskussion der Formel des Glutokyrin-β-sulfates auf Grund der für die Konstanten erhaltenen Werte 24
Anhang:
a) Anwendung der Formoltitrierung und der van Slykeschen Methode auf Sarkosin 28
b) Einwirkung von β-Naphtalinsulfochlorid auf Arginin 31

II. Teil:

Die Anwendung der Silberbarytmethode auf das Glutokyrin-β-sulfat 34

1. Bestimmung des durch Silberbaryt fällbaren und nicht fällbaren Stickstoffs 34
2. Die Einwirkung von Barythydrat (ohne Silbersulfat) auf das Glutokyrin-β-sulfat 35
3. Die Einwirkung von Silberbaryt auf Glutokyrin-β-sulfat und Bestimmung der Konstanten in der Summe der Spaltungsprodukte 36
4. Darstellung des Niederschlag- und Filtratsulfates 40
5. Untersuchungen des Niederschlagsulfates 41
6. Totale Hydrolyse des Niederschlagsulfates . . . 44
   a) Bestimmung des Formol-N 44
   b) Bestimmung des van Slyke-N 45
   c) Bestimmung der Menge des durch Phosphorwolframsäure fällbaren und nicht fällbaren Stickstoffs der Zersetzungsprodukte des Niederschlagsulfates 46
7. Untersuchungen des Filtratsulfates 50
8. Totale Hydrolyse des Filtratsulfates 53
   a) Bestimmung des Formol-N 53
   b) Bestimmung des van Slyke-N 54
   c) Bestimmung der Menge des durch Phosphorwolframsäure fällbaren und nicht fällbaren Stickstoffs der Zersetzungsprodukte des Filtratsulfates 55

III. Teil:

Die Einwirkung von 25 %iger Salzsäure (mit und ohne Zinnchlorür) und von 25 %iger Schwefelsäure auf das β-Glutokyrin 59

1. Geschichtliches über Lysatinin 59
2. Spaltung von β-Glutokyrin mit Zinnchlorür + Salzsäure und Isolierung der Base aus dem Phosphorwolframsäureniederschlag 61
   a) Darstellung und Untersuchung ihres Silbersalzes 61

b) Der Carbaminoquotient $\frac{CO_2}{N}$ 62
c) Bestimmung des Formol-N 64
d) Weiterbehandlung der Base nach der Silberbarytmethode 64
3. Einwirkung von 25 %iger Salzsäure (ohne Zinnchlorür) auf das Glutokyrin-β-sulfat 65
4. Einwirkung von 25 %iger Schwefelsäure auf das Glutokyrin-β-sulfat 67
IV. Teil:
Sind in dem Filtrate der Phosphorwolframsäurefällung des Rohkyrins noch intermediäre Eiweißspaltungsprodukte vorhanden, oder nur völlig abgespaltene Aminosäuren? 68
Totale Hydrolyse des Filtrates vom Rohkyrinphosphorwolframat 69
Anhang:
Bestimmungen des Carbamino- und Azylquotienten, des Formol- und van Slyke-N-Wertes in Peptonen 71
C. Ergebnisse der Untersuchung 77

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545813_0070

Einleitung.

Indem Siegfried[1]) (und seine Schüler) verschiedene Eiweißkörper einer allmählichen Hydrolyse unterwarfen, gelang es ihnen, größere Komplexe von den bei der totalen Hydrolyse auftretenden Spaltungsprodukten zu isolieren.

Siegfried gab ihnen, weil sie „wie ein Kern aus dem Proteinmolekül herausgeschält werden", den Namen Kyrine (τὸ κῦρος = der Kern). In gleicher Weise wie er das Glutokyrin aus dem Glutin darstellte, gewann er entsprechende basische Komplexe auch aus anderen Proteinkörpern, z. B. dem Kasein[2]), Fibrin[3]) und Haemoglobin.[4])

Die Sulfate der stark basischen Kyrine[5]) sind farblose hygroskopische Körper. In Wasser sind sie sehr leicht löslich, in Alkohol und Äther dagegen unlöslich.

Werden die Kyrine der totalen Hydrolyse unterworfen, so werden als Spaltungsprodukte u. a.: Arginin, Lysin und Glutaminsäure erhalten, das Glutokyrin-α liefert außerdem Glykokoll, das Kaseino- und Globinokyrin noch Histidin.

Außer den Sulfaten sind von den Salzen der Kyrine besonders die Phosphorwolframate von Wichtigkeit, weil sie — mit Ausnahme des Haemoglobinokyrinphosphorwolframates —

---

[1]) Ber. der sächs. Ges. der Wissenschaften zu Leipzig, math.-phys. Kl. 1903, S. 63.

[2]) M. Siegfried: Z. physiol. Chem. **50**, 163 (1906).

[3]) M. Siegfried: Z. physiol. Chem. **48**, 67 (1906).

[4]) H. Kirbach: Z. physiol. Chem. **50**, 129 (1906).

[5]) Literaturangaben siehe: Biochem. Handlexikon, Bd. IV: „Peptone und Kyrine", bearbeitet von M. Siegfried.

in schönen zu Drusen vereinigten Nadeln oder Sternchen kristallisieren, und somit das erste deutlich kristallisierende Salz eines Peptons darstellen.

Da, wie Todorowic[1]) zuerst gezeigt hat, Kyrine durch Behandeln mit Silberbaryt in 2 Körper oder Gemenge von Substanzen zerlegt werden, von denen die eine hauptsächlich die Argininggruppe, die andere die Lysingruppe enthält, ist es für die Eiweißchemie von besonderem Interesse festzustellen, ob bei der Einwirkung von Silberbaryt eine Trennung oder eine Spaltung eintritt. Denn im letzteren Falle würde bewiesen sein, daß Lysin und Arginin in einem engen Komplexe im Eiweiß verbunden sind.

[1]) B. Todorowic: Über die Einwirkung des Silbersulfates und Baryumhydroxyds auf das Glutokyrin-β-sulfat. Diss. Leipzig 1912.

A. Aufgabe der Arbeit.

Es wurde mir die Aufgabe gestellt, in erster Linie die neueren Methoden der Eiweißchemie: Carbaminoreaktion, Formoltitrierung, die van Slyke-Methode und Azylierung auf das β-Glutokyrinsulfat und seine Spaltungsprodukte anzuwenden und die Frage zu bearbeiten, ob durch Einwirkung von Silberbaryt nach Kossel eine Trennung von Komponenten oder eine Spaltung eintritt.

B. Eigene Untersuchungen.

I. TEIL.

Untersuchungen des Glutokyrin-β-sulfates.

1. Darstellung des Glutokyrin-β-sulfates.

a) Erste Darstellung.

500 g beste käufliche Ledergelatine (Theuerkauf u. Scheibner, Leipzig) wurden mit 5 Litern einer aus 1 Teil Wasser und 2 Teilen 25 %iger Salzsäure bestehenden Mischung vier Wochen lang im Siegfried'schen Verdauungsapparat[1]) bei einer sich zwischen 38° und 40° C. bewegenden Temperatur der allmählichen Hydrolyse unterworfen. Der Apparat wurde Tag und Nacht in Betrieb gelassen und dadurch eine intensivere Mischung und eventuell beschleunigte Zersetzung erreicht, als dies bei zeitweiligem Umschütteln der Fall wäre. Die mit dem doppelten Volumen Wasser verdünnte Zersetzungsflüssigkeit wurde filtriert und der sehr geringe auf dem Filter verbleibende Rückstand mit ca. 300 ccm Wasser ausgewaschen. In das mit dem Waschwasser vereinigte Filtrat ließ ich zunächst 1 Liter einer 10 %igen Phosphorwolframsäure-Lösung (PWS „Merck") eintropfen. Da ein Zusammenballen des Niederschlages vermieden werden mußte, wurde das Gemisch beim Zufließen der Phosphorwolframsäure-Lösung durch ein

[1]) Beschreibung des Verdauungsapparates siehe H. Kirbach: „Zur Kenntnis der allmählichen Hydrolyse des Pferdehaemoglobins" Inaug.-Diss. Leipzig 1906, S. 10.

mittels Motor getriebenes Rührwerk beständig in Bewegung gehalten. Die weitere Fällung wurde mit 1 Liter einer 25 %igen Phosphorwolframsäure-Lösung unter den gleichen Bedingungen vorgenommen. Auch hierbei war darauf zu achten, daß der Niederschlag nicht flockig, sondern körnig ausfiel. Die Fällung der Zersetzungslösung wurde schließlich mit 6 Litern einer 50 %igen Phosphorwolframsäure-Lösung beendet. Der so erhaltene Niederschlag von Rohkyrinphosphorwolframat war von gelblichweißer Farbe, toniger Beschaffenheit und setzte sich gut ab, sodaß die Mutterlauge leicht geprüft werden konnte, ob die Fällung eine vollständige war. Zu berücksichtigen war auch, daß sich Rohkyrinphosphorwolframat in einem Überschuß von Phosphorwolframsäure wieder löst, letzterer mußte also vermieden werden. Das Absaugen des Niederschlages ging — im Gegensatz zu der schweren Filtrierbarkeit der kalt gefällten Mischungen der Phosphorwolframate von Hexonbasen — sehr gut von statten. Das Auswaschen erfolgte mit ungefähr 6 Litern einer 5 %igen Schwefelsäure bis das Waschwasser chlorfrei war. Der Niederschlag wurde allmählich in Wasser von 30—40° C. eingetragen, in diesem zur Emulsion fein verrieben und sodann unter Zusatz von konzentriertem Ammoniak fast völlig gelöst. Die so erhaltene Lösung wurde mit fein gepulvertem Barythydrat (pro analysi Kahlbaum) unter Vermeidung eines nennenswerten Überschusses zersetzt. Filtrat und Waschwässer wurden mit etwas Ammonkarbonat von letzterem befreit und das hellgelbe Filtrat vom Baryumkarbonat im Vakuum bei einer Temperatur von 40—50° eingedampft. Der sirupöse Rückstand wurde nach den früher ausgearbeiteten Vorschriften in das Sulfat übergeführt und durch Einrühren in Alkohol gefällt. Die Ausbeute an Rohkyrinsulfat betrug 125 g. Zwecks weiterer Reinigung löste ich es in der gleichen Menge 5 %iger Schwefelsäure, fügte das gleiche Volumen Alkohol hinzu und verrührte die so erhaltene Lösung in 8 Liter absoluten Alkohols. Die Ausbeute des mit Alkohol schwefelsäurefrei gewaschenen und über Schwefelsäure im Vakuum getrockneten Glutokyrin-

β-sulfates betrug jetzt nur noch 90 g, ging aber nach weiteren drei Umfällungen bis auf 25 g zurück. Das Sulfat war also fünfmal umgefällt.

b) Zweite Darstellung.

Aus 750 g Gelatine wurden in der gleichen Weise 180 g Rohkyrinsulfat erhalten. 80 g desselben wurden durch viermaliges Umfällen aus 99 %igem Alkohol gereinigt. Ausbeute: 15 g.

Der Rest des Rohkyrinsulfates wurde nach einmaligem Umfällen aus absolutem Alkohol nach der Silberbarytmethode behandelt und sowohl aus dem Silberbarytniederschlag als auch aus dessen Filtrat das Sulfat dargestellt (S. 40).

c) Dritte Darstellung.

500 g Gelatine lieferten nach der ersten Alkoholfällung 120 g Rohkyrinsulfat. Nach weiteren fünf Umfällungen ging die Ausbeute auf ca. 25 g zurück. — Das Filtrat dieses Rohkyrinphosphorwolframates, einschließlich der Waschwässer, wurde zum Gegenstand besonderer Untersuchungen gemacht (S. 68 ff.).

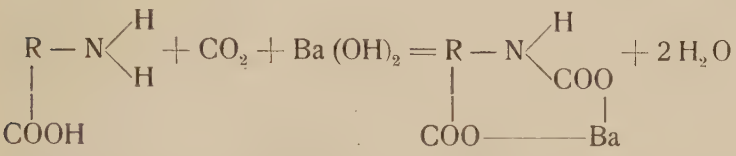
2. Prinzip der auf das Glutokyrin-β-sulfat angewandten Methoden.

Die folgenden Versuche, die mit fünf- bezw. sechsmal aus Alkohol umgefällten Glutokyrin-β-sulfat-Präparaten ausgeführt wurden, hatten den Zweck, früher ermittelte Konstanten für das Sulfat nachzuprüfen und sein Verhalten bei Anwendung der van Slyke'schen Methode und gegenüber β-Naphtalinsulfochlorid zu untersuchen.

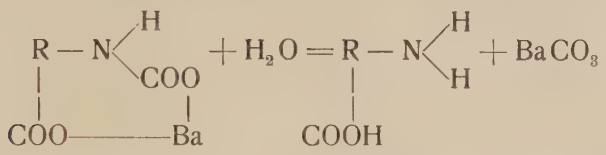
Außer den beiden letzterwähnten Methoden kamen besonders die Siegfried'sche Carbaminoreaktion, die Sörensen'sche Formoltitration und die Elementaranalyse in Betracht.

a) Die Carbamino-Reaktion nach Siegfried.[1])

Leitet man in die mit Eiswasser gekühlte Lösung einer Aminosäure in Baryt- oder Kalkwasser Kohlensäure ein, so wird letztere entionisiert und es entsteht das carbaminosaure Baryum bezw. Calcium:



dessen klare Lösung beim Erwärmen einen Zerfall in die freie Aminosäure und Baryum- bezw. Calciumcarbonat erleidet:



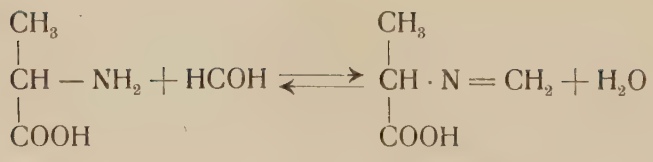
Der nach Siegfried's Angaben zu ermittelnde Carbaminoquotient $\frac{CO_2}{N}$ zeigt das Verhältnis der aufgenommenen Kohlensäure-Moleküle zu den Atomen Stickstoff der Verbindung an.

b) Die Formoltitrierung nach Sörensen.

Die Methode basiert auf der zuerst von H. Schiff[2]) gemachten Beobachtung, daß sich bei den Aminosäuren und den Proteinstoffen eine Trennung der Amin- und Säurefunktion durch Formaldehyd bewirken läßt:

[1]) M. Siegfried: Ergebnisse der Physiologie **9**, 334 (1910); Z. f. physiol. Chem. **44**, 85 (1905); **46**, 401 (1905). M. Siegfried und Neumann: Z. f. physiol. Chem. **54**, 423 (1908). — M. Siegfried und Liebermann: Z. f. physiol. Chem. **54**, 437 (1908). — Liebermann: Z. f. physiol. Chem. **58**, 84 (1908).

[2]) Ann. Chem. **310**, 25 (1899); ibid. **319**, 59 u. 287 (1901); ibid. **325**, 348 (1902).



Alanin Methylenalanin.

Wegen des sich bildenden Gleichgewichtszustandes ist jedoch eine vollständige Trennung der Amin- und Säurefunktion auf diese Weise nicht möglich. Nachdem Friedenthal und Salm[1]) darauf hingewiesen hatten, daß für diese Reaktion die Wahl des Indikators von großer Wichtigkeit ist, gelang es Sörensen[2]) die Schiff'sche Methode zu einer wenigstens annähernd quantitativen zu gestalten.

Von den beiden von Sörensen angegebenen Modifikationen:

a) der Phenolphthaleintitrierung
b) der Thymolphthaleintitrierung

gab ich letzterer den Vorzug.

Zur Titration der freien Carboxylgruppen wurde ausschließlich $\frac{n}{5}$ Natronlauge verwandt, da einerseits bei Anwendung einer halb so starken Lauge die Reaktion weniger quantitativ verläuft, andrerseits bei der Titration mit Barytlauge die Bildung von schwerlöslichen Salzen stattfinden kann, welche die Reaktion zu einer ungenauen gestalten.

Durch Anwendung einer nach den Angaben von Sörensen hergestellten Kontrollösung ließ sich der Endpunkt der Reaktion genau feststellen.

Besaß die zu titrierende Lösung, wie es bei den Hydrolysaten des Glutokyrin-β-sulfates und der aus ihm dargestellten Fraktionen der Fall war, einen gelblichen Farbton, so wurde auch die Kontrollösung durch Bismarckbraun (0.02 : 100) entsprechend gefärbt.

---

[1]) Biochem. Zeitschr. VII, S. 45 (1905).
[2]) ibid.

c) Die Bestimmung der aliphatischen Aminogruppen nach van Slyke.

Bekanntlich wirkt salpetrige Säure auf aliphatische Aminogruppen folgendermaßen ein:

$$R — NH_2 + HNO_2 = ROH + H_2O + N_2.$$

Sachs und Kormann[1]) und andere Autoren[2]) haben Methoden zur quantitativen Bestimmung von Aminogruppen angegeben, die auf obiger Reaktion fußen. Schneller und einfacher aber wird dieses Ziel durch das von van Slyke[3]) angegebene Verfahren erreicht. Diese Methode macht ferner von der Eigenschaft der salpetrigen Säure, in wäßriger Lösung nicht beständig zu sein, sondern folgendermaßen zu zerfallen, Gebrauch:

$$3\,HNO_2 \rightleftarrows H_2O + 2\,NO + HNO_3$$

Das entstehende Stickoxyd dient dazu, die Luft im van Slyke'schen Apparat[4]) vor dem Versuche zu ersetzen.

Läßt man auf die Lösung einer Aminosäure die von salpetriger Säure einwirken, so entsteht Stickstoff neben Stickoxyd. Sorgt man in geeigneter Weise für Absorption des letzteren durch eine alkalische Permanganatlösung, so kann

[1]) Zeitschr. für analyt. Chemie XIV, S. 380 (1875).

[2]) Vgl. König: Chemie der menschlichen Nahrungs- und Genußmittel. 4. Aufl., 3. Band, S. 274.

[3]) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. XLIII, S. 3170 (1910): Donald D. van Slyke: Eine Methode zur quantitativen Bestimmung der aliphat. Aminogruppen; einige Anwendungen derselben in der Chemie der Proteine, des Harns und der Enzyme. — Ausführlicher im Journ. Biol. Chemistry IX, 185 (1911): Donald D. v. Slyke: A method for quantitative determination of aliphatic groups, applications to the study of proteolysis and proteolytic products.

[4]) Vgl. Abderhalden: Biochem. Arbeitsmethoden, Bd. VI, S. 278 (1912).

die Menge des aus der Aminosäure entwickelten Amino-Stickstoffs an einer mit dem Apparat in Verbindung stehenden Glasbürette abgelesen und unter Berücksichtigung des Druckes und der Temperatur in sein Gewicht umgerechnet werden.

Die für den Versuch benötigte salpetrige Säure wird zweckmäßig aus reinem Natriumnitrit[1]) durch Zusatz einer schwachen Säure, z. B. Essigsäure, in Freiheit gesetzt. Man gibt letzterer vor starken Mineralsäuren den Vorzug, um eine zu befürchtende Säurehydrolyse der zu untersuchenden Substanz zu verhindern.

d) Die Naphtalinsulfochloridmethode nach Fischer und Bergell. Der „Azylquotient".

Nachdem Hedin[2]) Reaktionsprodukte der Aminosäuren mit Benzolsulfochlorid dargestellt hatte, sind von E. Fischer und P. Bergell[3]) solche mit β-Naphtalinsulfochlorid und von M. Siegfried[4]) solche mit o. Nitrotoluolsulfochlorid beschrieben worden. Die Anwendung solcher Sulfonsäuren auf höher molekulare Körper ist deshalb besonders fruchtbar, weil man über den Umfang der Reaktion durch Bestimmung des Stickstoffs einerseits und des Schwefels andrerseits unterrichtet wird, somit durch Stickstoff- und Schwefel-Bestimmungen der erhaltenen Derivate erfährt, ein wie großer Teil der Stickstoffgruppen mit den Säurechloriden reagiert.

Siegfried hat — wie derselbe an anderer Stelle angeben wird — für das Atomverhältnis $\frac{S}{N}$ den Namen „Azylquotient" eingeführt.

---

[1]) Da das Nitrit des Handels häufig verunreinigt ist, so ist die Anstellung eines sog. blinden Versuches mit diesem notwendig.

[2]) Hedin: Berl. Ber. **23**, 3197 (1890).

[3]) E. Fischer: Berl. Ber. **33**, 2380 (1900); **34**, 448 (1901); E. Fischer u. P. Bergell: Berl. Ber. **35**, 3779 (1902).

[4]) Siegfried: Z. physiol. Chem. **43**, 68 (1904).

3. Die Bestimmung der Konstanten des Glutokyrin-β-sulfates.

a) Der Carbaminoquotient $\frac{CO_2}{N}$.

Aus mehreren Proben Glutokyrin-β-sulfat wurde durch Ausfällen der Schwefelsäure mit Barythydrat in kleinem Überschuß, Entfernen des letzteren durch Ammonkarbonat und Eindampfen des Filtrats auf dem Wasserbade bis zur NH_3-Freiheit die Base dargestellt und diese carbaminiert.

1. Glutokyrin-β-sulfat: Zweite Darstellung.

Gef. $CaCO_3$: 0,1344 g, verbr. 40,6 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4; $\frac{CO_2}{N} = \frac{1}{3.02}$

2. Glutokyrin-β-sulfat: Dritte Darstellung.

Gef. $CaCO_3$: 0,1221 g, verbr. 36,4 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4; $\frac{CO_2}{N} = \frac{1}{2.98}$

3. Glutokyrin-β-sulfat: Dritte Darstellung.

Gef. $CaCO_3$: 0,1299 g, verbr. 38,2 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4; $\frac{CO_2}{N} = \frac{1}{2.94}$

b) Bestimmung des Formol-N.

1. 1.0442 g Glutokyrin-β-sulfat (2. Darst.) in Wasser gelöst, neutralisiert mit Natronlauge und mit Wasser auf 50 ccm aufgefüllt.

α) 10 ccm Lösung erf. n. Zusatz von 15 ccm Formolmischung 3,9 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH, verbr. n. Kj. 19,4 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4;
Formol-N = 40,2 % vom Gesamt-N.

β) 10 ccm Lösung, ebenso behandelt, erf. 3,8 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH, verbr. n. Kj. 19,3 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4;
Formol-N = 39,4 % vom Gesamt-N.

γ) 10 ccm Lösung erf. n. Kj. 19,7 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

2. 0,5580 g Glutokyrin-β-sulfat (3. Darst.) in Wasser gelöst, mit Natronlauge neutralisiert und mit Wasser auf 50 ccm aufgefüllt.

α) 10 ccm Lösung erf. n. Zusatz von 15 ccm Formolmischung 2,3 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH, verbr. n. Kj. 12,0 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4; Formol-N = 38,3 % vom Gesamt-N.

β) 10 ccm Lösung erf. nach der gleichen Behandlung 2,5 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH und 12,2 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4 n.Kj.; Formol-N = 41,7 % vom Gesamt-N.

c) Die Bestimmung des van Slyke-N.

Versuch	Angew. Lösung in ccm	Bar. in mm	Temp.	Dauer der Einwirkung der salpetr. Säure in Minuten	N_2 in ccm	ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4	% Slyke-N vom Ges.-N
I	10	750	17°	5	7,7	12,1	25,9
	10	750	17°	10	10,5	12,1	35,3
	10	750	17°	30	11,2	12,1	37,7
	10	750	17°	60	11,5	12,1	38,7
II	10	750	17°	5	7,8	12,1	26,2
	10	750	17°	10	10,3	12,1	34,6
	10	750	17°	30	11,1	12,1	37,3
	10	750	17°	60	11,7	12,1	39,3

d) Der Azylquotient $\frac{S}{N}$.

α) Etwa 2,5 g β-Glutokyrinsulfat (I) wurden mit der ätherischen Lösung von 15 g β-Naphtalinsulfochlorid und im ganzen 120 ccm n Natronlauge nach Fischers Angaben in Reaktion gebracht. Die durch Salzsäure aus der alkalischen Lösung abgeschiedene Naphtalinsulfoverbindung wurde in stark verdünnter Natronlauge gelöst und wiederum durch Salzsäure ausgeschieden. Ausbeute 2,2 g. Die Naphtalinsulfoverbindung des β-Glutokyrins

bildet ein weißes amorphes Pulver, das in Wasser, Benzol und Schwefelkohlenstoff unlöslich, in Alkohol und Chloroform dagegen löslich ist. Der Schmelzpunkt liegt bei 137° C., bei 100° C. tritt ein starkes Zusammensintern ein.

Zur Analyse wurde die Substanz über Schwefelsäure im Vakuum bis zum konstanten Gewicht getrocknet.

Analysen:

1. 0,2143 g Substanz gaben nach Verschmelzen mit völlig SO_4-freiem Ätznatron und Salpeter in der Silberschale: 0,1618 g $BaSO_4$; S = 10,8 %.

2. 0,1422 g Substanz erforderten nach Kjeldahl 8,1 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4; N = 8,0 %.

Dividiert man die gefundenen Prozentzahlen durch die entsprechenden Atomgewichte, setzt S = 1, so erhält man für das Glutokyrin-β-sulfat den Azylquotienten

$$\frac{S}{N} = \frac{1}{1.7}.$$

β) 1,6 g Glutokyrin-β-sulfat (3. Darst.) wurden in 19,2 ccm n Natronlauge gelöst und mit weiteren dreimal je 19,2 ccm n Natronlauge und der ätherischen Lösung von 9,6 g β-Naphtalinsulfochlorid 4 Stunden lang geschüttelt. Die alkalische Lösung wurde im Scheidetrichter von der ätherischen getrennt und in verdünnte Salzsäure eingerührt. Ausbeute des über Schwefelsäure im Vakuum getrockneten Naphtalinsulfokyrins: 1,2 g.

Analysen:

1. 0,2536 g Substanz gaben 0,1953 g $BaSO_4$; S = 10,58 %.
2. 0,1230 g Substanz erf. n. Kj. 7,0 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4; N = 7,97 %.

Mithin

$$\frac{S}{N} = \frac{1}{1.72}.$$

e) Elementaranalyse.

Zu den Analysen wurden die Substanzen im Siegfried'schen Trockenapparat bei der Temperatur siedenden Alkohols bis zum konstanten Gewicht getrocknet. Das Trocknen dauerte in der Regel 10 Tage.

1. 0,1522 g Sbst.: 0,1812 g CO_2, 0,0976 g H_2O.
   C = 32,47 %; [H = 7,18 %] [1])
2. 0,1683 g Sbst.: 0,1998 g CO_2, 0,0952 g H_2O.
   C = 32,37 %; H = 6,33 %.
3. 0,2010 g Sbst.: 0,2391 g CO_2, 0,1124 g H_2O.
   C = 32,44 %; H = 6,26 %.
4. 0,1168 g Sbst. erf. n. Kj. 13,3 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4:
   N = 15,95 %.
5. 0,2042 g Sbst. erf. n. Kj. 23,2 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4:
   N = 15,90 %.
6. 0,8012 g Sbst. gaben nach Verschmelzen mit Natriumhydroxyd und Salpeter in der Silberschale: 0,6076 g $BaSO_4$;
   S = 10,42 %.
7. 0,7074 g Sbst. gaben nach der gleichen Behandlung: 0,5344 g $BaSO_4$;
   S = 10,38 %.

Die C-, H- und S-Werte stimmen mit den von Siegfried und Pilz[2]) erhaltenen überein, die N-Werte sind etwas niedriger als die von letzterem Verfasser nach Dumas erhaltenen.

4. Totale Hydrolyse des Glutokyrin-β-sulfates und Bestimmung der Konstanten in der Summe der Spaltungsprodukte.

1,5208 g Glutokyrin-β-sulfat (3. Darst.) wurden mit der zehnfachen Menge 30 %iger Schwefelsäure 12 Stunden am Rückflußkühler gekocht und aus dem Hydrolysat in der üblichen Weise die Base isoliert, die nach der Neutralisation mit Schwefelsäure mit Wasser zu 50 ccm gelöst wurde.

[1]) Ist als herausgefallen nicht zu berücksichtigen.
[2]) Z. f. physiol. Chem. **58**, 222. (1908/9).

a) Bestimmung des Formol-N.

1. 10 ccm Lösung erf. n. Zusatz von 15 ccm Formolmischung 9,1 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH, verbr. n. Kj. 31,9 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4;
Formol-N = 57,0 % vom Gesamt-N.
2. 10 ccm Lösung erf. n. Zusatz von 15 ccm Formolmischung 9,3 ccm $\frac{n}{10}$ NaOH, verbr. n. Kj. 32,2 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4;
Formol-N = 57,8 % vom Gesamt-N.

b) Bestimmung des van Slyke-N.

Versuch	Angew. Lösung in ccm	Bar. in mm	Temp.	Dauer der Einwirkung der salpetr. Säure in Minuten	N_2 in ccm	ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4	% Slyke-N vom Ges. N.
I	10	749	19°	5	28,7	32,05	36,0
	10	749	19°	10	38,6	32,05	48,5
	10	749	19°	30	44,6	32,05	56,0
	10	749	19°	60	45,3	32,05	56,9
II	5	749	18°	5	14,5	16,0	36,6
	5	749	18°	10	19,4	16,0	49,0
	5	749	18°	30	22,6	16,0	57,1
	5	749	18°	60	23,1	16,0	58,4

c) Der Carbaminoquotient $\frac{CO_2}{N}$.

Aus dem mit der 10 fachen Menge 30 %iger Schwefelsäure gespaltenen Glutokyrin-β-sulfat wurde die Base in der üblichen Weise isoliert und diese der Carbaminoreaktion unterworfen.

1. Gef. $CaCO_3$ = 0,2066 g, verbr. 37.4 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4;
$$\frac{CO_2}{N} = \frac{1}{1.81}.$$
2. Gef. $CaCO_3$ = 0,2732 g, verbr. 50.0 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4;
$$\frac{CO_2}{N} = \frac{1}{1.83}.$$

Weitere Werte vgl. S. 67.

d) Der Azylquotient $\frac{S}{N}$.

Etwa 2,5 g Glutokyrin-β-sulfat (3. Darst.) wurden mit der zehnfachen Menge 30%iger Schwefelsäure durch 10stündiges Kochen am Rückflußkühler der totalen Hydrolyse unterworfen. Das Gemenge der Spaltungsprodukte wurde mit der ätherischen Lösung von 12 g β-Naphtalinsulfochlorid und insgesamt 96,0 ccm n-Natronlauge 4 Stunden geschüttelt. Ätherische und alkalische Lösung wurden im Scheidetrichter getrennt und letztere in verdünnte Salzsäure verrührt.

Das über Schwefelsäure im Vakuum getrocknete Naphtalinsulfoderivat stellt im Gegensatz zu der entsprechenden Verbindung des β-Glutokyrins ein Pulver von mehr gelblichem Farbton dar, das den Schmelzpunkt von 92° besitzt. Ausbeute: 1,3 g.

Analysen:

1. 0,3690 g Sbst.: 0,3360 g $BaSO_4$; S = 12,51%.
2. 0,2418 g Sbst. erf. n. Kj. 13,4 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4; N = 7,76%.

$$\frac{S}{N} = \frac{1}{1.42}.$$

5. Diskussion der Formel des Glutokyrin-β-sulfates auf Grund der für die Konstanten erhaltenen Werte.

Nachdem durch die vorhergehenden Versuche die Werte des Glutokyrin-β-sulfates für den Carbamino- und den Azylquotienten, für formoltitrierbaren- und van Slyke-N, sowie die Resultate der Elementaranalyse vorliegen, ist eine Diskussion dieser Werte und einer aus ihnen für das Glutokyrin-β-sulfat zu entwickelnden Formel möglich.

Siegfried und Pilz[1]) haben zuerst als Spaltungsprodukte des Gluto-β-kyrins Arginin, Lysin und Glutaminsäure nachweisen können.

[1]) L. c.

Versucht man aus diesen Spaltungsprodukten das Gluto-β-kyrin aufzubauen, so gelangt man für dasselbe zu folgender Formel:

Arginin	$C_6H_{14}N_4O_2$
Lysin	$C_6H_{14}N_2O_2$
Glutaminsäure	$C_5H_9NO_4$
	$C_{17}H_{37}N_7O_8$
$-2H_2O$	$H_4 \quad O_2$
	$C_{17}H_{33}N_7O_6$

Dem Glutokyrin-β-sulfat käme dann folgende Zusammensetzung zu:

β-Glutokyrin:	$C_{17}H_{33}N_7O_6$
$+2H_2SO_4$:	$H_4 \quad O_8S_2$
	$C_{17}H_{37}N_7O_{14}S_2$

Die aus dieser Formel berechneten Werte stimmen mit den durch Elementaranalyse des Salzes gefundenen gut überein:

	Berechnete Werte für $C_{17}H_{37}N_7O_{14}S_2$	Gefundene Werte (Mittel)
C:	32.5 %	32.4 %
H:	5.9 %	6.3 %
N:	15.6 %	15.9 %
S:	10.2 %	10.4 %

Es ist aber zu betonen, daß hier, wie meist in der Eiweißchemie, die elementare Zusammensetzung nicht beweisend ist, da sie bei verschieden zusammengesetzten Verbindungen oft nur wenig abweicht.

Nimmt man für das Glutokyrin-β-sulfat oben entwickelten Aufbau nach Art der synthetischen Peptide Emil Fischers an, so müßte, unter der Voraussetzung, daß bei der totalen Hydrolyse erwähnte Komponenten glatt entstehen, der durch Phosphorwolframsäure fällbare Stickstoff $^6/_7$ des Gesamtstickstoffs = 85.7 % betragen. M. Siegfried[1]) hat in der Tat den durch Phosphorwolframsäure fällbaren Teil des Stickstoffs im Glutokyrin-β-sulfat zu 86 % bestimmt.

[1]) Z. f. physiol. Chem. **58**, 222. (1908/9).

Wertvoll zur Entscheidung der Frage, ob dem Glutokyrin-β-sulfat die oben genannte Formel zugesprochen werden kann, ist die Bestimmung der Konstanten der Summe der Spaltungsprodukte dieses Körpers (S. 22ff.).

Erbringt der Umstand, daß diese Werte von denen des Ausgangsmaterials verschieden sind, einmal einen einwandsfreien Beweis dafür, daß das Glutokyrin-β-sulfat kein bloßes Gemisch von Aminosäuren ist, so sprechen die für das Produkt des Hydrolysates gefundenen Werte auch gleichzeitig zugunsten der von uns für das Glutokyrin-β-sulfat angenommenen Formel.

Während der gesamte Stickstoff des Lysins und der Glutaminsäure formoltitrierbar ist, tritt von den 4 Stickstoffatomen des Arginins nur 1 mit Formol in Reaktion. Besteht also die gemachte Annahme, das Glutokyrin-β-sulfat setze sich aus je 1 Molekül Arginin, Lysin und Glutaminsäure zusammen, zu Recht, so müssen in seinem Hydrolysat von 7 Stickstoffatomen 4, oder vom Gesamtstickstoff der Summe der Spaltungsprodukte rund 57 % formoltitrierbar sein. Dieser Wert wurde in den diesbezüglichen Versuchen tatsächlich erhalten (S. 23).

Ungleich wertvollere Dienste wie beim Glutokyrin-β-sulfat leistete die Anwendung der van Slyke'schen Methode auf das Hydrolysat dieses Körpers, da in diesem Falle der salpetrigen Säure lediglich ein Gemisch von Aminosäuren zu Gebote steht, und somit eine andere als im erwünschten Sinne verlaufende Reaktion nicht zu befürchten ist. Der dem Formol-N entsprechende Wert wird infolge des Lysingehaltes der Spaltungsflüssigkeit erst nach halbstündiger Einwirkung der salpetrigen Säure erreicht.

Da von den 4 Stickstoffatomen des Arginins 1, vom Lysin 2 und von der Glutaminsäure 1 die Carbaminoreaktion eingeht, so wäre theoretisch für die Summe der Spaltungsprodukte der Carbaminoquotient $= \frac{1}{1.75}$ zu erwarten, dem die durch die Versuche im Mittel zu $\frac{1}{1.82}$ gefundenen Werte nahe kommen, sodaß auch hierdurch die Zusammensetzung des

Glutokyrin-β-sulfates im erwähnten Sinne wahrscheinlich gemacht ist.

Endlich spricht auch der Azylquotient, den die aus dem Hydrolysat des Gluto-β-kyrins gewonnene Base liefert, für die Annahme unserer Formel. Wie später zu erörtern ist (S. 31 ff.), reagieren von den 4 Stickstoffatomen des Arginins 2 mit β-Naphtalinsulfochlorid, während beim Lysin und der Glutaminsäure der gesamte Stickstoff mit letzterem in Reaktion tritt. Mit dem zu erwartenden Azylquotienten $\frac{5}{7} = \frac{1}{1.4}$ stimmt der gefundene gut überein.

Aus dem Umstand, daß das Glutokyrin-β-sulfat in Übereinstimmung mit früher bei anderen Präparaten gefundenen den Carbaminoquotienten $\frac{1}{3}$ besitzt, geht hervor, daß diesem Körper der Charakter einer einheitlichen chemischen Verbindung zuzusprechen ist.

An und für sich besagt dieser Quotient, daß von 3 Stickstoffatomen eines quantitativ mit Kohlensäure reagiert. Nimmt man die oben entwickelte hypothetische Formel für das Glutokyrin-β-sulfat an, so wäre für $\frac{CO_2}{N}$ ein Wert etwa von $\frac{2}{7} = \frac{1}{3.5}$ zu erwarten. Nun aber reagieren auch die Peptidgruppen, wenn auch nur bis zu einem gewissen Grade, mit Kohlensäure, wie Siegfried und Liebermann[1]) nachgewiesen haben; so würde der im Vergleich zum erwarteten zu hoch befundene Wert für $\frac{CO_2}{N}$ mit der für das Glutokyrin-β-sulfat angenommenen Zusammensetzung wohl vereinbar sein.

Die NH_2-Gruppen der Aminosäuren und die Säureamidgruppen zeigen gegenüber der Einwirkung von Formol das gleiche Verhalten wie gegen Kohlensäure: erstere reagieren vollständig, letztere gar nicht.

Aus den für das Glutokyrin gefundenen Formol- und van Slyke-N-Werten läßt sich ein bestimmter Schluß auf dessen Konstitution nicht ziehen. Da Peptidbindungen, die, wie wir

[1]) Z. f. physiol. Chem **54**, 437 (1908).

in der oben für das β-Glutokyrin entwickelten Formel angenommen haben, weder gegen Formol noch gegen salpetrige Säure reagieren, so ergeben sich, wie die diesbezüglichen Versuche gezeigt haben, andere Werte, als die aus dem gefundenen Carbaminoquotienten berechneten. Gesetzt den Fall, das β-Glutokyrin wäre ein Tripeptid, so wäre für Formol- und van Slyke-N ein Wert von 28,5 % zu erwarten; da die Versuche aber wesentlich höhere Zahlen ergeben, so muß man, wenn man das Vorhandensein von Peptidbindungen schon gelten läßt, doch neben diesen noch andere Bindungen oder Gruppen im β-Glutokyrin annehmen, die gegen Formol- und salpetrige Säure reagieren, und so den — im Vergleich mit dem erwarteten — zu hohen Formol-N-Wert des β-Glutokyrins erklären helfen. Es wurde an solche Bindungen gedacht, wie sie z. B. im Sarkosin vorliegen.

a) Anwendung der Formoltitrierung und der van Slyke'schen Methode auf Sarkosin.

Bestimmung des Formol-N.

Obwohl nach einer von Löb[1]) gemachten Angabe dieser Körper nicht formoltitrierbar sein sollte, wurden 0,3606 g exsikkatortrocknes Sarkosin in Wasser zu 50 ccm gelöst und in der neutralen Lösung (Lackmus) sowohl der Gesamt-N nach Kjeldahl, als auch der Formol- und van Slyke-N bestimmt.

1. 10 ccm Lösung erf. nach Zusatz von 15 ccm Formolmischung 3,9 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH; Formol-N = 15,2 %.
2. 10 ccm Lösung erf. nach Zusatz von 15 ccm Formolmischung 3,9 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH; Formol-N = 15,2 %.
3. Die formoltitrierten Lösungen wurden vereinigt und in ihnen der Gesamt-N nach Kjeldahl bestimmt:

   Verbraucht: 15,7 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4

   Gefunden: Gesamt-N = 15,3 %.

   Berechnet für $C_3H_7NO_2$: Gesamt-N = 15,7 %.

[1]) Löb: Biochem. Zeitschr. **51**, 126 (1913).

Durch diesen Versuch wurde also — entgegen der von Löb gemachten Angabe — festgestellt, daß der gesamte Stickstoff des Sarkosins formoltitrierbar ist. In einer inzwischen erschienenen Abhandlung von Clementi[1]) fand ich das von mir schon früher gefundene Resultat bestätigt.

Bestimmung des van Slyke-N.

1. 10 ccm Lösung lieferte nach 5—10—20 Minuten langer Einwirkung von salpetriger Säure keinen van Slyke-N.
2. Parallelversuch mit 10 ccm Lösung ebenfalls negativ.

Der Umstand, daß bei Anwendung der van Slyke'schen Methode auf Sarkosin keine Stickstoffentwicklung eintritt, würde, da der Wert des für das Glutokyrin-β-sulfat nach 5 Minuten langer Einwirkung von salpetriger Säure gefundenen van Slyke-N hinter dem Formol-N-Werte zurückbleibt, die Möglichkeit, daß sich im Kyrin Bindungen nach Art der im Sarkosin vorliegenden finden, nicht ausschließen. Die Erhöhung des van Slyke-N-Wertes im Glutokyrin-β-sulfat nach einer länger als 5 Minuten währenden Einwirkung der salpetrigen Säure würde dann auf eine Spaltung, die der Körper durch das Agens erleidet, zurückzuführen sein, und es wäre hier einer von den Fällen gegeben, in denen — worauf auch schon andere Verfasser[2]) hingewiesen haben — die van Slyke'sche Methode nicht immer mit Erfolg zur Kontrolle der Formoltitration herangezogen werden kann. Das Sarkosin selbst liefert einen Beweis für die Richtigkeit dieser Behauptung. Außer der Möglichkeit, daß im Glutokyrin-β-sulfat Bindungen nach Art der im Sarkosin gegebenen vorhanden sind, bestehen auch noch andere, mit deren Hilfe sich der zu hoch befundene Formol-N-Wert des Glutokyrin-β-sulfates erklären ließe.

---

[1]) Antonio Clementi: Chem. Centr. Nr. **20**, I. 1089 (1915).
[2]) Abderhalden und Kramm: Z. f. physiol. Chem. **77**, 428 (1912).

Die Versuche von Kossel und seinen Schülern[1]) haben es wahrscheinlich gemacht, daß in den Protaminen zwei verschiedenartige freie Aminogruppen anzunehmen sind, von denen die eine dem Arginin, die andere bei den Lysin enthaltenden Protaminen dem Lysin angehört. Während Kohlensäure, Formol und salpetrige Säure auf die freie Guanidinaminogruppe des Arginins nicht einwirken, zeigen sich diese Agentien gegenüber der freien Aminogruppe des Lysins als reaktionsfähig.

Liegen die Verhältnisse zwar so bei den lysinhaltigen Protaminen, so wäre es doch gewagt, sie allgemein auf Proteine auszudehnen, da einerseits damit zu rechnen ist, daß außer der Aminogruppe des Lysins sich im Molekül des zu untersuchenden Eiweißkörpers noch andere formoltitrierbare Gruppen finden können, andererseits auch die Möglichkeit zu berücksichtigen ist, daß verschiedenartige Bindungen des Lysins vorliegen.

Gehört das Glutokyrin-β-sulfat zwar schon zu den einfacher gebauten Körpern, so ist es doch immerhin noch kompliziert genug, sodass man nicht berechtigt ist, den für dasselbe ermittelten Formol-N-Wert als lediglich durch das Vorhandensein einer freien Aminogruppe eines Lysinkomplexes bedingt anzusehen.

Für das Vorhandensein einer freien Aminogruppe des Lysinkomplexes im Glutokyrin-β-sulfat spricht zwar der Umstand, daß der nach 5 Minuten langer Einwirkung der salpetrigen Säure bei der Methode van Slyke gefundene Slyke-N-Wert hinter dem ermittelten Formol-N-Wert zurückbleibt und diesen erst nach $^1/_2$ stündiger Einwirkung der salpetrigen Säure erreicht. Es entspricht dies den von van Slyke[2]) gemachten

[1]) Kossel und Kenna: Z. physiol. Chem. **72**, 486 (1911). — Kossel und Cameron: ibid. **76**, 456 (1912). — Kossel und Weiss: ibid. **78**, 402 (1912). — Kossel und Gawrilow: ibid. **81**, 274 (1912).

[2]) van Slyke: Abderh. Bioch. Arbeitsmethoden, Bd. V, 2, S. 1002. (1912).

Erfahrungen, nach denen Lysin zum Eingehen einer quantitativen Reaktion einer $^1/_2$stündigen Einwirkung der salpetrigen Säure bedarf, während bei anderen Aminosäuren wie Glykokoll, Glutaminsäure etc. die Reaktion bereits nach 5 Minuten beendet ist.

Durch Darstellung des β-Naphtalinsulfoderivates des Glutokyrins hoffte ich in Erfahrung zu bringen, welche Gruppen in diesem Körper Kohlensäure zu binden vermögen.

Wenn von 3 N-Atomen nur das einer Aminogruppe quantitativ mit Kohlensäure reagiert, so müssen auf die gleiche Anzahl N-Atome auch eine Naphtalinsulfogruppe in das Molekül des Glutokyrin-β-sulfates eintreten, somit der Azylquotient $\frac{1}{3}$ erhalten werden.

Der diesbezügliche Versuch ergab, das fast die doppelte Anzahl Sulfogruppen in das Molekül eintreten.

Durch die folgenden Versuche hoffte ich eine Erklärung für dieses Resultat zu finden.

b) Einwirkung von β-Naphtalinsulfochlorid auf Arginin.

1. Versuch von O. Riesser:

Da das Arginin eine Dibenzoylverbindung bildet, überraschte mich um so mehr die Angabe O. Riessers,[1]) daß im Arginin nur eine NH_2-Gruppe der Einwirkung von Naphtalinsulfochlorid zugänglich sein solle. Aus diesem Grunde wiederholte ich den von Riesser gemachten Versuch.

2. Darstellung der Naphtalinsulfoverbindung des Arginins aus Arginindinitrat.

Die Lösungen von 0,7 g Arginindinitrat in 4,66 ccm n-Natronlauge und von 2,1134 g β-Naphtalinsulfochlorid in 30 ccm Äther I wurden zusammengegeben und geschüttelt. In Zeiträumen von 1 $^1/_2$ Stunden wurden weiterhin dreimal je 4,66 ccm n-Natronlauge zugefügt. Die beim Ansäuern der alkalischen Lösung

[1]) O. Riesser: Z. physiol. Chem. **49**, 210 (1906).

mit Salzsäure entstehenden öligen Anteile löste ich — abweichend von Riessers Angaben — nicht in heißem Alkohol und Wasser, sondern in verdünnter Natronlauge, versetzte die Lösung mit frischer Tierkohle und rührte das Filtrat abermals in verdünnte Salzsäure ein. Auf diese Weise gelang es, auch den Rest der Argininnaphtalinsulfoverbindung in Form eines weißen Pulvers zu erhalten. Ausbeute: 0,6 g.
Die Bestimmung des Schwefels in dem Naphtalinsulfoderivat des Arginins erfolgte nach Liebig, die des Stickstoffs nach Kjeldahl:

1. 0.2067 g Sbst. gaben 0.1868 g $BaSO_4$; S = 12.42 %.
Ber. für $C_6H_{13}N_4O_2 \cdot SO_2H_7C_{10}$: S = 8.8 %.
Ber. für $C_6H_{12}N_4O_2(SO_2H_7C_{10})_2$: S = 11.57 %.

2. 0.0988 g Sbst. erf. nach Kj. 7.1 ccm $\cdot \frac{n}{10}$ H_2SO_4;
N = 10.07 %.
Ber. für $C_6H_{13}N_4O_2 \cdot SO_2H_7C_{10}$: N = 15.4 %.
Ber. für $C_6H_{12}N_4O_2(SO_2H_7C_{10})_2$: N = 10.11 %.

$$\frac{S}{N} \quad \frac{1}{1.86}$$

3. Darstellung der Naphtalinsulfoverbindung des Arginins aus Argininmononitrat.

2,046 g Argininmonitrat wurde mit der ätherischen Lösung von 7,8215 g β-Naphtalinsulfochlorid und insgesamt 70 ccm n-Natronlauge 6 Stunden lang geschüttelt. Die aus der alkalischen Lösung durch verdünnte Salzsäure ausgefällte Naphtalinsulfoverbindung wurde im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Ausbeute ca. 1,5 g.

1. 0.2270 g Sbst. gaben 0,1979 g $BaSO_4$; S = 11.98 %.
Ber. für $C_6H_{13}N_4O_2 \cdot SO_2H_7C_{10}$: S = 8.8 %.
Ber. für $C_6H_{12}N_4O_2(SO_2H_7C_{10})_2$: S = 11.57 %.

2. 0.1013 g Sbst. erf. n. Kj. 7.44 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4;
N = 10.29 %.

Ber. für $C_6H_{13}N_4O_2 \cdot SO_2H_7C_{10}$: N = 15.4 %.
Ber. für $C_6H_{12}N_4O_2(SO_2H_7C_{10})_2$: N = 10.11 %.

$$\frac{S}{N} = \frac{1}{1.97}.$$

Die Ergebnisse dieser Versuche erbringen also den Beweis, daß von den 4 N Atomen des Arginins nicht nur 1, sondern 2 mit β-Naphtalinsulfochlorid in Reaktion treten. Die Entscheidung der Frage, ob außer der einen von Riesser als reaktionsfähig erkannten NH_2-Gruppe auch die andere, oder etwa eine NH-Gruppe mit β-Naphtalinsulfochlorid zu reagieren vermag, wird die Aufgabe weiterer Untersuchungen sein.

Das vorläufige Ergebnis der mit Arginin angestellten Versuche kommt uns insofern zu statten, als durch dasselbe einerseits eine Erklärung für den aus der Summe der Spaltungsprodukte des Glutokyrins zu $\frac{1}{1.42}$ ermittelten Azylquotienten gegeben ist, andrerseits unsere Annahme, daß sich das Glutokyrin aus äquimolekularen Mengen Arginin, Lysin und Glutaminsäure zusammensetze, eine weitere Bestätigung findet. Aus dem für das Glutokyrin selbst zu $\frac{1}{1.7}$ ermittelten Azylquotienten kann man höchstens auf das Vorhandensein einer freien Argininguppe schließen.

II. TEIL.

Die Anwendung der Silberbarytmethode auf das Glutokyrin-β-sulfat.

1. Bestimmung des durch Silberbaryt fällbaren und nicht fällbaren Stickstoffs.

Die von A. Kossel[1]) ausgearbeitete Silberbarytmethode beruht bekanntlich darauf, daß durch Silbersalze und Barythydrat das Arginin als Silberverbindung abgeschieden und so von Lysin getrennt wird.

Seitdem es Kossel[2]) gelungen war, eine Trennung von Protonen mit Hilfe dieser Methode zu bewirken, mußte auch beim Glutokyrin mit dieser Möglichkeit gerechnet werden. Die diesbezüglichen Versuche, die von Siegfried und Lindner[3]) mit dem Trypsincaseinpepton ausgeführt waren, hatten gezeigt, daß dieser Körper durch Silberbaryt keine Fällung und Zersetzung erleidet.

Siegfried und Todorowic[4]) haben festgestellt, daß durch Anwendung der Silberbarytmethode auf Glutokyrin-β-sulfat zwei Fraktionen erhalten werden. In Fortführung dieser Untersuchungen sollte vor allem geprüft werden, ob hierbei eine Trennung vorher gemengter Bestandteile oder eine Spaltung bewirkt wird.

Alle meine diesbezüglichen Versuche wurden mit Reinkyrin, das 5- bezw. 6 mal umgefällt war, ausgeführt. Über das Verhältnis der durch Silberbaryt fällbaren und nicht fällbaren Menge Stickstoffs geben folgende Versuche Auskunft:

---

[1]) Z. physiol. Chem. **25**, 165 (1898).
[2]) ibid. **49**, 301 (1906).
[3]) Pflügers Archiv **136**, 185 (1910).
[4]) Z. physiol. Chem. **84**, 288 (1913).

1. Zu der Lösung von 0,1683 g Glutokyrin-β-sulfat (I. Darst.) in 10 ccm Wasser wurde so viel einer heißgesättigten Silbersulfatlösung gegeben, bis ein dem Reaktionsgemisch entnommener Tropfen mit Barytwasser einen gelblichbraunen Niederschlag gab. Der auf Zimmertemperatur abgekühlte Kolbeninhalt wurde mit Barythydrat (alkalifrei, Kahlbaum) gesättigt, der Niederschlag abgesaugt und mit Barytwasser ausgewaschen und sowohl im Niederschlag als auch im Filtrat der Stickstoff nach Kjeldahl ermittelt.

Der Niederschlag erforderte: 9.60 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Das Filtrat erforderte: 4.96 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Durch Silberbaryt fällbar N = 65.9 % v. Ges. N.

Durch Silberbaryt nicht fällbar N = 34.1 % v. Ges. N.

2. 0.1274 g Glutokyrin-β-sulfat (I. Darst.) wurden nach der Silberbarytmethode behandelt und dann im Niederschlag und Filtrat der Stickstoff bestimmt.

Der Niederschlag erforderte 7.29 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Das Filtrat erforderte: 3.82 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Durch Silberbaryt fällbar N = 65.6 % vom Ges. N.

Durch Silberbaryt nicht fällbar N = 34.4 % vom Ges. N.

2. Die Einwirkung von Barythydrat (ohne Silbersulfat) auf Glutokyrin-β-sulfat.

Zunächst wurden 2 Versuche ausgeführt, die den Zweck hatten, festzustellen, ob schon durch Baryt allein eine Veränderung des Glutokyrin-β-sulfates stattfindet. Im zutreffenden Falle würde sie in einem anderen Werte des Carbaminoquotienten zum Ausdruck kommen.

1. 0.9988 g Glutokyrin-β-sulfat (I. Darst.) wurden in Wasser gelöst und die Lösung mit 10 g feingepulvertem Barythydrat versetzt und bis zur Sättigung geschüttelt. Das Gemisch wurde drei Stunden lang bei Zimmertemperatur stehen

gelassen, der Niederschlag abfiltriert und mit Wasser ausgewaschen. Das Filtrat und Waschwasser wurden mit Ammonkarbonat auf dem Wasserbade digeriert, der Niederschlag abfiltriert und das Filtrat auf dem Wasserbad wiederholt bis zur NH_3-Freiheit eingedampft. Der firnisähnliche Rückstand wurde carbaminiert.

Gef. $CaCO_3$: 0.1756 g, verbr. 50,7 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4;

$$\frac{CO_2}{N} = \frac{1}{2.89}.$$

2. 0.8050 g Glutokyrin-β-sulfat (I. Darst.) wurden wie unter 1 angegeben behandelt und der erhaltene Rückstand carbaminiert.

Gef. $CaCO_3$: 0.1470 g, verbr. 41.6 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4;

$$\frac{CO_2}{N} = \frac{1}{2.83}.$$

Der Wert des Carbaminoquotienten ist also ungefähr der gleiche geblieben, wie der für das Glutokyrin-β-sulfat ermittelte. (S. 19).

3. Die Einwirkung von Silberbaryt auf Glutokyrin-β-sulfat und Bestimmung der Konstanten in der Summe der Spaltungsprodukte.

a) Der Carbaminoquotient.

Nachdem somit die Ergebnisse vorigen Versuchs gelehrt hatten, daß das Glutokyrin-β-sulfat durch die Behandlung mit Barythydrat eine Veränderung nicht erfährt, galt es nunmehr festzustellen, ob letzteres in Verbindung mit Silbersulfat eine solche zu bewirken imstande sei. In diesem Falle würde sie in einer Erhöhung des Carbaminoquotienten, gegenüber dem beim Glutokyrin-β-sulfat gefundenen Werte, zum Ausdruck kommen, vorausgesetzt, daß bei der Reaktion eine oder mehrere Peptidbindungen gelöst werden.

1. 1.0568 g Glutokyrin-β-sulfat (I. Darst.) wurden mit Silbersulfat und Barythydrat behandelt.

Um zu prüfen, ob durch Silberbaryt eine Trennung oder eine Spaltung stattfindet, wurde der Silberbaryt-niederschlag nicht abfiltriert, das Reaktionsgemisch vielmehr drei Stunden lang bei gewöhnlicher Temperatur und unter häufigem Umrühren stehen gelassen, darauf mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert, das Silber durch Einleiten von Schwefelwasserstoff gefällt und abfiltriert, letzterer durch einen Luftstrom verjagt, die Schwefelsäure durch Barythydrat entfernt und der geringe Überschuß an letzterem durch Digerieren mit Ammonkarbonat auf dem Wasserbad gefällt. Das Filtrat vom Baryumkarbonat wurde auf dem Wasserbad bis zur NH_3-Freiheit eingedampft und der schließlich verbleibende Rückstand der Carbaminoreaktion unterworfen.

Gef. $CaCO_3$: 0.0940 g, verbr. 50.9 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4;

$$\frac{CO_2}{N} = \frac{1}{5.42}.$$

2. 1.0241 g Glutokyrin-β-sulfat (I. Darst.) wurde genau nach den unter 1 angegebenen Bedingungen behandelt und schließlich carbaminiert.

Gef. $CaCO_3$: 0.0909 g, verbr. 50.0 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4;

$$\frac{CO_2}{N} = \frac{1}{5.50}.$$

Es trat also keine Erhöhung des Quotienten, sondern im Gegenteil eine Erniedrigung ein. Diese Ergebnisse, die im Einklang mit den von M. Siegfried und B. Todorowic[1]) gefundenen stehen, beweisen, daß die Art der Einwirkung von Silberbaryt auf Glutokyrin-β-sulfat einer Hydrolyse dieses Körpers mit 30%iger Schwefelsäure nicht gleich zu achten ist, da in diesem Falle ein wesentlich höherer Carbaminoquotient (vgl. S. 23) erhalten werden müßte.

[1]) L. c.

Eine Erklärung für den niedrigen Carbaminoquotienten kann man nur darin finden, daß man annimmt, es entstehen bei der Einwirkung von Silberbaryt auf das β-Glutokyrin Produkte, von denen ein großer Teil der Carbaminierung dadurch entgeht, daß er schwerlösliche Calciumverbindungen bildet, die im ersten Kalkniederschlag verbleiben. Der zu $\frac{1}{5.47}$ gefundene Carbaminoquotient repräsentiert daher nicht den Quotienten aus der Summe der Spaltungsprodukte des β-Glutokyrins, sondern nur des Teiles derselben, der bei der Carbaminierung nicht in den ersten Kalkniederschlag übergeht.

Siegfried[1]) hat aus dem ersten Kalkniederschlag die Substanz regeneriert und gefunden, daß sich in ihm hauptsächlich Produkte mit einem hohen Carbaminoquotienten finden, wodurch es sich erklärt, daß der bei der Carbaminierung der Spaltungsprodukte gefundene Quotient einen so niedrigen Wert hat.

Um zu prüfen, ob das Glutokyrin-β-sulfat bei einer länger als 3 Stunden dauernden Einwirkung von Silberbaryt eine noch weitergehende Veränderung erfährt, wurden 2.5143 g Glutokyrin-β-sulfat (I. Darst.) mit Silbersulfat und Barythydrat behandelt. Das Gemisch wurde 6 Stunden lang bei gewöhnlicher Temperatur und unter häufigem Umrühren stehen gelassen, der Niederschlag nicht abfiltriert und in der früher angegebenen Weise weiter behandelt. Auf die isolierte Base wurde die Carbaminoreaktion angewandt.

1. Gef. $CaCO_3$: 0.0899 g, verbr. 51.5 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4;

$$\frac{CO_2}{N} = \frac{1}{5.73}.$$

2. Gef. $CaCO_3$: 0.0918 g, verbr. 49.7 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4;

$$\frac{CO_2}{N} = \frac{1}{5.41}.$$

Eine Änderung des Carbaminoquotienten war also nicht eingetreten; die Reaktion des Kyrins mit Silbersulfat und Barythydrat ist daher schon nach 3 Stunden als beendet anzusehen.

[1]) M. Siegfried: Z. physiol. Chem. **84**, 293 (1913).

Mit einer durch Silberbaryt bewirkten Veränderung des Glutokyrin-β-sulfates kann gleichzeitig eine Lösung von Peptidbindungen erfolgen. In diesem Falle wird die Summe der Reaktionsprodukte des Glutokyrins einen höheren Formol-N-Wert besitzen als das Ausgangsmaterial.

b) Bestimmung des Formol-N.

Aus 2.0024 g Glutokyrin-β-sulfat wurde nach dreistündiger Einwirkung von Silberbaryt (ohne Filtrieren!) in üblicher Weise die Base isoliert, diese mit Schwefelsäure neutralisiert und mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt.

1. 10 ccm Lösung verbrauchten nach Zusatz von 15 ccm Formolmischung: 3.9 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH. Verbraucht n. Kj. 18.9 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4; Formol-N = 41.3 % vom Ges.-N.
2. 10 ccm Lösung verbrauchten nach Zusatz von 15 ccm Formolmischung 3.7 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH. Verbraucht n. Kj. 18.9 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4; Formol-N = 39.2 % v. Ges.-N.

Der Gehalt an formoltitrierbarem Stickstoff hat also durch die Behandlung des Glutokyrin-β-sulfates mit Silberbaryt nicht zugenommen. — Dagegen lieferte dieselbe Lösung, die zur Formoltitrierung benutzt worden war, höhere Werte für van Slyke-N; doch geht man wohl nicht fehl, wenn man die Reaktion in diesem Falle schon nach 10 Minuten langer Einwirkung der salpetrigen Säure als beendet ansieht.

c) Bestimmung des van Slyke-N.

Versuch	Angew. Lösung in ccm	Bar. in mm	Temp.	Dauer d. Einwirkung von salpetr. Säure in Minuten	N_2 in ccm	ccm n/10 H_2SO_4	% Slyke-N vom Ges.-N.
I	10	760	19°	5	16,6	18,9	35,9
	10	760	19°	10	18,4	18,9	39,8
	10	760	19°	30	23,0	18,9	49,7
	10	760	19°	60	25,9	18,9	56,0
II	10	760	19°	5	16,7	18,9	36,1
	10	760	19°	10	18,6	18,9	40,2
	10	760	19°	30	23,3	18,9	50,4
	10	760	19°	60	25,8	18,9	55,8

Nachdem durch die vorhergehenden Versuche festgestellt war, daß das Glutokyrin-β-sulfat durch die Behandlung mit Silberbaryt eine Spaltung erfährt, wurden die beiden aus dem Glutokyrin nach der Einwirkung von Silberbaryt dargestellten Fraktionen (in den folgenden Versuchen kurz als „Niederschlag-" und „Filtratsulfat" bezeichnet) zum Gegenstand weiterer Untersuchungen gemacht.

4. Darstellung des Niederschlag- und Filtratsulfates.

Etwa 80 g einmal aus Alkohol umgefällten β-Glutokyrinsulfates (2. Darst.) wurden in Wasser gelöst und so lange mit einer heißen wäßrigen Silbersulfatlösung versetzt, bis ein Tropfen des Reaktionsgemisches mit Barytwasser einen gelbbraunen Niederschlag gab. Zu dem auf Zimmertemperatur abgekühlten Kolbeninhalt wurde so viel frisch gepulvertes Barythydrat gegeben, bis sich nichts mehr löste. Der mit gesättigtem Barytwasser ausgewaschene Silberbarytniederschlag wurde in Wasser fein verteilt, nach dem Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure Schwefelwasserstoff eingeleitet, vom Schwefelsilber abfiltriert, das Filtrat durch Durchleiten von Luft von dem überschüssigen Schwefelwasserstoff befreit und mit Barythydrat versetzt, der geringe Überschuß an letzterem durch Ammonkarbonat entfernt und das Filtrat NH_3-frei eingedampft. Der Rückstand wurde in wenig 10 %iger Schwefelsäure gelöst, 50 %ige Schwefelsäure bis zum positiven Ausfall der Kongoreaktion zugegeben und das Ganze auf eine 5 % Schwefelsäure enthaltende Lösung gebracht. Nach dem Verdünnen mit dem gleichen Volumen absoluten Alkohols wurde die Sulfatlösung in 5 Liter absoluten Alkohols verrührt. Die Ausbeute des abgeschiedenen Niederschlagsulfates betrug nach dem Auswaschen mit 99 %igem Alkohol und Trocknen im Vakuum über Schwefelsäure: 34 g.

In der gleichen Weise, wie das Niederschlagsulfat aus der Silberbarytfällung, wurde das Filtratsulfat aus dem Filtrat des Silberbarytniederschlages gewonnen. Ausbeute: 18 g.

Das Filtratsulfat ist viel leichter löslich in Alkohol als das Kyrin- und Niederschlagsulfat.

5. Untersuchungen des Niederschlagsulfates.

Zur Charakterisierung des Niederschlagsulfates wurden die gleichen Konstanten wie beim Glutokyrin-β-sulfat ermittelt.

a) Der Carbaminoquotient $\frac{CO_2}{N}$.

Bei der Carbaminierung der aus dem Niederschlagsulfat in der üblichen Weise erhaltenen Base wurden folgende Werte erhalten:

1. Gef. $CaCO_3$: 0.0987 g; verbr. 50.5 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4;
$$\frac{CO_2}{N} = \frac{1}{5.12}.$$
2. Gef. $CaCO_3$: 0.0842 g; verbr. 42.5 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4;
$$\frac{CO_2}{N} = \frac{1}{5.05}.$$

Im Vergleich zu dem für das Glutokyrin-β-sulfat gefundenen Carbaminoquotienten ist der des Niederschlagsulfates fast halb so groß und nähert sich dem Werte des Quotienten, der bei der Carbaminierung des ohne Trennung des Niederschlages vom Filtrate durch Silberbaryt erhaltenen Produktes erhalten wurde (S. 37).

b) Bestimmung des Formol- und van Slyke-N.

Zur Bestimmung des Formol- und van Slyke-Stickstoffs wurden 1.6530 g Niederschlagsulfat in Wasser gelöst, mit Natronlauge neutralisiert und mit Wasser auf 50 ccm aufgefüllt.

1. 10 ccm Lösung erf. nach Zusatz von 15 ccm Formolmischung 5.4 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH, verbr. n. Kj. 37.3 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.
Formol-N = 29.0 % vom Gesamt-N.

2. 10 ccm Lösung erf. n. Zusatz von 15 ccm Formolmischung 5.6 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH, verbr. n. Kj. 37.6 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Formol-N = 29.8 % vom Gesamt-N.

Während der Gehalt an Formol-N im Glutokyrin-β-sulfat in Übereinstimmung mit den Resultaten der Siegfried'schen [1]) Versuche von mir zu 39—40 % gefunden wurde, weicht der ermittelte Formol-N-Wert für das Niederschlagsulfat von den Werten, die genannter Verfasser fand, ab (23.55 %).

In allen diesen Fällen weist das Niederschlagsulfat einen geringeren Gehalt an Formol-N auf als das Glutokyrin-β-sulfat.

Dadurch ist einerseits ein zweiter Beweis dafür erbracht, daß das Niederschlagsulfat seiner Zusammensetzung nach vom Glutokyrin-β-sulfat abweicht, andrerseits lehrt dieser Versuch, daß dem Niederschlagsulfat der Charakter eines einheitlichen Individuums nicht zugesprochen werden kann.

Eine weitere Bestätigung, daß Niederschlag- und Glutokyrin-β-sulfat nicht identisch sind, lieferte die Bestimmung des van Slyke-Stickstoffs:

Versuch	Angew. Lösung in ccm	Bar. in mm	Temp.	Dauer der Einwirkung der salpetr. Säure in Minuten	N_2 in ccm	ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4	% Slyke-N vom Ges.-N.
I	10	750	18°	5	21,7	37,45	23,5
	10	750	18°	10	23,1	37,45	25,0
	10	750	18°	30	24,9	37,45	26,9
	10	750	18°	60	27,6	37,45	29,8
II	10	750	19°	5	21,5	37,45	23,1
	10	750	19°	10	23,3	37,45	25,1
	10	750	19°	30	24,6	37,45	26,5
	10	750	19°	60	27,8	37,45	29,9

Daß der für das Niederschlagsulfat gefundene Formol-N-Wert erst nach ungefähr $^1/_2$ stündiger Einwirkung der salpetrigen

[1]) L. c.

Säure erreicht wird, spricht dafür, daß das Niederschlagsulfat eine Lysingruppe enthält. Andrerseits scheinen die niedrigen Formol- und van Slyke-N-Werte (nach 5 Minuten langer Einwirkung der salpetrigen Säure) darauf hinzudeuten, daß im Niederschlagsulfat das Arginin vorherrscht.

Da die Formol- und van Slyke-N-Werte des Niederschlagsulfates von den für das Glutokyrin-β-sulfat ermittelten abweichen, so ist damit ein weiterer Beweis dafür geliefert, daß diese beiden Körper nicht identisch sind und die Annahme, daß das Glutokyrin-β-sulfat durch die Behandlung mit Silberbaryt als schwerlösliches Silbersalz in den Niederschlag ginge, widerlegt.

Einen weniger großen Unterschied weisen die Azylquotienten des Glutokyrin-β-sulfates und des Niederschlagsulfates auf.

c) Der Azylquotient $\frac{S}{N}$.

Etwa 1 g Niederschlagsulfat wurde mit der ätherischen Lösung von 4.53 g β-Naphtalinsulfochlorid und insgesamt 80 ccm n Natronlauge 6 Stunden lang geschüttelt. Nach Verlauf von $4\,^1/_2$ Stunden erfolgte die Abscheidung einer festen Verbindung, die abfiltriert und getrennt untersucht wurde. $N = 0.5\,\%$.

Die aus der alkalischen Lösung mittels verdünnter Salzsäure abgeschiedene Naphtalinsulfoverbindung des Niederschlagsulfates wurde mit Wasser ausgewaschen und über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute des gelblichweißen Derivats betrug ca. 0.8 g. Schmelzpunkt 105°.

Analysen:

1. 0.3123 g Sbst. g. nach Verschmelzen mit Natriumhydroxyd und Salpeter in der Silberschale: 0.2816 g $BaSO_4$; $S = 12.39\,\%$.
2. 0.0986 g Subst. erf. n. Kj. 5.8 ccm $\frac{n}{10}\,H_2SO_4$; $N = 8.24\,\%$.

$$\frac{S}{N} = \frac{1}{1.52}.$$

3. 0.2943 g Sbst. g. 0.2566 g $BaSO_4$; S = 11.98 %.
4. 0.1053 g Sbst. erf. n. Kj. 6.15 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4; N = 8.18 %.

$$\frac{S}{N} = \frac{1}{1.56}.$$

Aus dem Umstande, daß für das Glutokyrin-β-sulfat und das Niederschlagsulfat abweichende Werte für die Konstanten gefunden wurden, kann nur der Schluß gezogen werden, daß ersteres durch die Behandlung mit Silberbaryt eine Veränderung erfahren hat. Es wäre ja möglich, daß durch die Anwendung der Kossel'schen Methode auf das Glutokyrin-β-sulfat eine Spaltung in die Aminosäuren: Arginin, Lysin und Glutaminsäure stattfände. Hiergegen spricht außer dem Ergebnis der früheren Versuche (S. 37) auch der Befund, daß der Carbaminoquotient des Niederschlagsulfates $\frac{1}{5}$ ist, während Arginin, das sich ausschließlich im Niederschlage befinden würde, wenn die Spaltung bis zur Bildung der Aminosäuren gegangen wäre, den Quotienten $\frac{1}{4}$ gibt. Ganz besonders zeigen die folgenden Versuche, daß die Spaltung des Glutokyrin-β-sulfates durch Silberbaryt nicht bis zu dem oben angenommenen Grade vollzogen ist.

6. Totale Hydrolyse des Niederschlagsulfates.

Etwa 3 g Niederschlagsulfat wurden mit 10 g konzentrierter Schwefelsäure + 20 g Wasser 10 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht. Die aus dem Hydrolysat in der üblichen Weise isolierte Base wurde mit Schwefelsäure neutralisiert und mit Wasser auf 250 ccm aufgefüllt.

a) Bestimmung des Formol-N.

1. 10 ccm Lösung erf. nach Zusatz von 15 ccm Formolmischung 7.8 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH, verbr. n. Kj. 44.6 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4. Formol-N = 35.0 % vom Gesamt-N.
2. 10 ccm Lösung erf. nach Zusatz von 15 ccm Formolmischung 7.9 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH, verbr. n. Kj. 44.9 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4. Formol-N = 35.2 % vom Gesamt-N.

Der Wert für Formol-N hat sich also gegenüber dem bei der Titration des Niederschlagsulfates gefundenen erhöht. Das gleiche Ergebnis hatte

b) die Bestimmung des van Slyke-N.

Versuch	Angew. Lösung in ccm	Bar. in mm	Temp.	Dauer der Einwirkung der salpetr. Säure in Minuten	N_2 in ccm	ccm n 10 H_2SO_4	% Slyke-N vom Ges.-N.
I	10	750	18°	5	31,9	44,75	28,9
	10	750	18°	10	33,0	44,75	29,9
	10	750	18°	30	34,3	44,75	31,0
	10	750	18°	60	36,0	44,75	32,6
II	10	750	18°	5	32,2	44,75	29,1
	10	750	18°	10	33,3	44,75	30,1
	10	750	18°	30	34,5	44,75	31,2
	10	750	18°	60	36,4	44,75	32,9

Das Niederschlagsulfat besteht daher nicht lediglich aus Arginin, sondern aus komplizierteren Körpern, die Peptid- oder andere Bindungen aufweisen müssen, da die Formol- und van Slyke-N-Werte des Niederschlagsulfates von den für seine Zersetzungslösung gefundenen abweichen.

Als Spaltungsprodukte haben Siegfried und Todorowic[1]) Arginin und Lysin nachgewiesen.

Mittelwerte für:	Niederschlag sulfat	Summe der Produkte der vollständigen Hydrolyse des Niederschlagsulfates
% Formol-N	29.4	35.1
% Slyke-N (10 Min. lange Einw. von salp. Säure)	25.1	30.0

[1]) L. c.

Durch die Behandlung mit Silberbaryt hat das Glutokyrin-β-sulfat mithin keine vollständige Spaltung erfahren.

c) Bestimmung der Menge des durch Phosphorwolframsäure fällbaren und nicht fällbaren Stickstoffs der Zersetzungsprodukte des Niederschlagsulfates.

Um einerseits die Verteilung des Stickstoffs im Niederschlagsulfat festzustellen und andererseits, um zu prüfen, ob sich unter den Spaltungsprodukten des Niederschlagsulfates auch Glutaminsäure befindet, wurden 5.0470 g Niederschlagsulfat mit 50 ccm 30 %iger Schwefelsäure der totalen Hydrolyse unterworfen und das Reaktionsgemisch nach dem Erkalten mit Wasser auf 250 ccm aufgefüllt.

1. 5 ccm Lösung erf. n. Kj. 10.7 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.
2. 5 ccm Lösung erf. n. Kj. 10.7 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

180 ccm der Zersetzungslösung wurden durch Verdünnen mit 50 ccm Wasser auf eine 5 % freie Schwefelsäure enthaltende Lösung gebracht und mit 280 ccm einer 10 %igen Phosphorwolframsäurelösung gefällt. Das Gemisch wurde auf dem Wasserbade erwärmt und über Nacht stehen gelassen. Der Phosphorwolframsäureniederschlag wurde abfiltriert und mit 225 ccm 5 %iger Phosphorwolframsäure-Schwefelsäure ausgewaschen, dann nacheinander mit Barythydrat und Ammonkarbonat behandelt und auf dem Wasserbade NH_3-frei eingedampft. Der Rückstand wurde in Wasser zu 250 ccm gelöst („Lösung A“).

Das Filtrat des Phosphorwolframsäureniederschlags wurde ebenfalls nacheinander mit Barythydrat und Ammonkarbonat behandelt, das Filtrat vom Baryumkarbonat NH_3-frei eingedampft und der Rückstand zur Prüfung auf Glutaminsäure verwandt („Lösung B“.)

Um die Verteilung des Stickstoffs im Niederschlagsulfat zu bestimmen, wurde die von Siegfried[1]) verbesserte Hausmann'sche[2]) Methode angewandt.

Für 1 Liter Mutterlauge beträgt die Korrektion 15.2 ccm $\frac{n}{10}$ Schwefelsäure, für 1 Liter Waschflüssigkeit (5 %ige Phosphorwolframsäure-Schwefelsäure) die Hälfte dieses Wertes.

1. 10 ccm der „Lösung A" erf. 12.2 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4 + Korr. 0.3 ccm = 12.50 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4

2. 10 ccm der „Lösung A" erf. 12.2 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4 + Korr. 0.3 ccm = 12.50 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4

Mittel: = 12.50 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4

250 ccm der „Lösung A" erf. 312.5 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Dies ist die Menge des in 180 ccm ursprünglicher Zersetzungslösung enthaltenen durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoffs.

180 ccm Zersetzungslösung erf. n. Kj. 385.2 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

250 ccm der „Lösung A", 180 ccm Zers.-Lös. entspr., erf. n. Kj. 312.5 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4,

mithin:

Durch PWS fällbarer Stickstoff = 81.1 % vom Ges.-N.

Dieser durch Phosphorwolframsäure fällbare Stickstoff verteilt sich auf Arginin und Lysin. Der Silberbarytniederschlag von je 10 ccm der „Lösung A" verbr. n. Kj. 9.3 bezw. 9.5, im Mittel 9.4 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, mithin enthält das Niederschlagsulfat:

Arginin N = 61.0 %
Lysin N = 20.1 % } = 81.1 % durch PWS fällb. Stickstoff,
Glutaminsäure N = 18.9 %.

Dadurch findet auch das Ergebnis des folgenden Versuches seine Erklärung:

[1]) Z. physiol. Chem. **43**, 56 (1904—1905).
[2]) ibid. **27**, 95 (1899).

10 ccm der Zersetzungslösung des Niederschlagsulfates wurden direkt mit Silberbaryt behandelt.

Der Niederschlag erforderte n. Kj. 17.8 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4,

das Filtrat 3.6 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Niederschlag N = 83.2 % vom Gesamt-N.

Gleichzeitig mit dem Arginin ist also die Glutaminsäure in den Silberbarytniederschlag übergegangen.

Der aus der „Lösung B“ gewonnene Rückstand wurde in wenig Wasser aufgenommen, wiederholt mit Tierkohle gekocht, das Filtrat auf ca. 3 ccm eingedampft und dann gasförmige Salzsäure unter Kühlen des als Reaktionsgefäß benutzten Wägegläschens im Kohlensäureschnee bis zur Sättigung eingeleitet. Es gelang auf diese Weise nicht, die Glutaminsäure zur Abscheidung zu bringen; das Reaktionsgemisch wurde deshalb 14 Tage im Eisschrank gelassen, worauf sich feine Kriställchen ausschieden, die mit Hilfe der mikroanalytischen Chlorbestimmung als Glutaminsäurechlorhydrat erkannt wurden. Ausbeute: 0.3 g.

1. 9.143 mg Sbst. gaben 7.229 mg AgCl; Cl = 19.56 %.
2. 9.437 mg Sbst. gaben 7.325 mg AgCl; Cl = 19.20 %.

Ber. für $C_5H_9NO_4HCl$: Cl = 19.32 %.

Nachdem es somit geglückt war, Glutaminsäure unter den Spaltungsprodukten des Niederschlagsulfates nachzuweisen, war es von Interesse zu erfahren, ob sich diese im Molekül des Niederschlagsulfates selbst vorfindet, oder etwa als freie Aminosäure bei der Einwirkung von Silberbaryt entstanden war. Denn es könnte eingewendet werden, daß die Glutaminsäure durch Silberbaryt mit dem Niederschlagssulfate ausgefällt worden wäre, da ja Glutaminsäure durch Silberbaryt gefällt wird. Deshalb wurde die Lösung des Niederschlagsulfates mit Phosphorwolframsäure ausgefällt und nun die aus diesem Phosphorwolframsäure-Niederschlag erhaltene Substanz der völligen Hydrolyse unterworfen.

Zu diesem Zwecke wurden 4.9827 g Niederschlagsulfat in 150 ccm 5 %iger Schwefelsäure gelöst und die Lösung sodann mit Phosphorwolframsäure gefällt. Nach mehrstündigem Digerieren auf dem Wasserbade wurde der Phosphorwolframsäure-Niederschlag abfiltriert, mit 5 %iger Schwefelsäure ausgewaschen und aus ihm in der üblichen Weise die Base dargestellt. Nachdem letztere mit 50 ccm einer 30 %igen Schwefelsäure 12 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht war, wurde das Reaktionsgemisch mit Phosphorwolframsäure gefällt. Das Filtrat des Phosphorwolframsäure-Niederschlages wurde erst mit Barythydrat, dann mit Ammonkarbonat behandelt und das Filtrat vom Baryumkarbonat schließlich auf dem Wasserbade bis zur NH_3-Freiheit eingedampft. Der verbleibende Rückstand wurde in Wasser gelöst und mit soviel NH_3 versetzt, daß 1 Tropfen Phenolphtaleinlösung eine eben bleibende Rötung bewirkte. Dann wurde von einer 10 %igen Silbernitratlösung soviel zugegeben als noch ein Niederschlag erfolgte. Dieser wurde absitzen gelassen und die darüberstehende Flüssigkeit zunächst mit 10 %iger Silbernitrat- und schließlich einer frisch bereiteten ammoniakalischen Silberlösung versetzt. Als keine Abscheidung mehr erfolgte, wurde der Niederschlag abgesaugt, mit wenig Wasser ausgewaschen und über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute betrug 1.2 g. Das trockne Salz wurde in einer Reibschale mit wenig Wasser fein verrieben, in einen Erlenmeyerkolben übergeführt, mit Essigsäure angesäuert und auf dem Wasserbade erwärmt. Durch Einleiten von Schwefelwasserstoff wurde das Silber entfernt, der Niederschlag mit heißem Wasser wiederholt ausgewaschen und Filtrat mit Waschwasser auf dem Wasserbad eingedampft. Der Rückstand wurde in wenig Wasser gelöst, mit gasförmiger Salzsäure gesättigt und 14 Tage in den Eisschrank gestellt. Es erfolgte Abscheidung von Kristallen, die in Wasser gelöst und mit etwas Tierkohle gekocht wurden. Das Filtrat wurde eingeengt, die Einleitung von Salzsäure wiederholt und abermals abgekühlt. Ausbeute: 0.2 g. Schmelzpunkt: 206° C.

Mikroanalysen:

1. 9.782 mg Substanz gaben 7.508 mg AgCl; Cl = 18.99 %.
2. 8.256 mg Substanz gaben 6.317 mg AgCl; Cl = 18.93 %.

Ber. für $C_5H_9NO_4HCl$: Cl = 19.32 %.

Die Ergebnisse der mit dem Niederschlagsulfat angestellten Versuche sind dahin zusammenzufassen:

Das Niederschlagsulfat ist mit dem Glutokyrin-β-sulfat nicht identisch, denn die entsprechenden Werte für den Carbamino- und Azylquotienten, für Formol- und van Slyke-N weichen von einander ab. Den Charakter eines einheitlichen Körpers, wie er nach den Ergebnissen der Untersuchungen dem Glutokyrin-β-sulfat zugesprochen werden muß, kann das Niederschlagsulfat nicht beanspruchen.

7. Untersuchungen des Filtratsulfates.

Das Filtratsulfat zeigte, im Gegensatz zum Niederschlagsulfat, große Neigung zum Verschmieren. Bei der Umfällung aus Alkohol bereitet es wegen seiner relativ leichten Löslichkeit in diesem manchmal große Schwierigkeiten. Aus diesem Grunde mußte auch von einer fünffachen Umfällung, wie sie beim Glutokyrin-β-sulfat durchgeführt worden war, Abstand genommen werden.

Zur Bestimmung des Formol- und van Slyke-N wurden 1.0575 g Filtratsulfat in Wasser gelöst, mit Natronlauge neutralisiert und mit Wasser auf 50 ccm aufgefüllt.

a) Bestimmung des Formol-N.

1. 10 ccm Lösung erf. n. Zusatz von 15 ccm Formolmischung 5.8 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH, verbr. n. Kj. 15.2 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.
   Formol-N = 76.3 % vom Gesamt-N.
2. 10 ccm Lösung erf. n. Zusatz von 15 ccm Formolmischung 6.0 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH, verbr. n. Kj. 15.8 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.
   Formol-N = 75.9 % vom Gesamt-N.

Im Gegensatz zum Niederschlagsulfat ist die Hauptmenge des Gesamtstickstoffs im Filtratsulfat formoltitrierbar.

Während die aus dem Niederschlagsulfat gewonnene Base reich an Arginin ist, scheint in der des Filtratsulfates das Lysin vorzuherrschen.

Eine Bestätigung dieser Annahme liefern die für das Filtratsulfat erhaltenen van Slyke-N-Werte.

b) Die Bestimmung des van Slyke-N.

Versuch	Angew. Lösung in ccm	Bar. in mm	Temp.	Dauer der Einwirkung der salpetr. Säure in Minuten	N_2 in ccm	ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4	% Slyke-N vom Ges.-N.
I	10	748	19°	5	18,4	15,5	47,7
	10	748	19°	10	24,7	15,5	64,0
	10	748	19°	30	29,4	15,5	76,2
	10	748	19°	60	30,0	15,5	77,8
II	10	748	18°	5	18,7	15,5	48,7
	10	748	18°	10	24,9	15,5	64,9
	10	748	18°	30	29,8	15,5	77,6
	10	748	18°	60	30,2	15,5	78,7

Um zu prüfen, ob die Base des Filtratsulfates Lysin im freien Zustande enthält, wurde aus 2.9722 g Filtratsulfat die Base in der üblichen Weise dargestellt und diese nach Angabe

von M. Siegfried[1]) mit einer konzentrierten Lösung von 8 g Platinchlorid digeriert. Eine Abscheidung von kristallinischem Lysinplatinchlorid erfolgte nicht.

c) Der Azylquotient $\frac{S}{N}$.

Einen weiteren Beweis für die Verschiedenheit von Niederschlag- und Filtratsulfat lieferte die Bestimmung des Azylquotienten in der Naphtalinsulfoverbindung des Filtratsulfates.

Ca. 1 g Filtratsulfat wurde mit der ätherischen Lösung von 4.53 g β-Naphtalinsulfochlorid und insgesamt 80 ccm n Natronlauge 6 Stunden lang geschüttelt. Die aus der alkalischen Lösung durch Salzsäure ausgeschiedene Naphtalinsulfoverbindung verschmierte und wurde daher nochmals in wenigen ccm verdünnter Natronlauge gelöst und abermals durch Salzsäure ausgefällt. Ausbeute der über Schwefelsäure im Vakuum getrockneten Verbindung: 0.9 g. Sie stellte ein gelblich-weißes Pulver dar, das den Schmelzpunkt 95° besaß, nachdem bei 75° ein Zusammensintern eingetreten war.

Analysen:

1. 0.3324 g Sbst. g. nach Verschmelzen mit NaOH und KNO_3 in der Silberschale: 0.2748 g $BaSO_4$. S = 11.36%.
2. 0.1087 g Subst. erf. n. Kj. 4.4 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4; N = 5.67%.
$$\frac{S}{N} = \frac{1}{1.14}.$$
3. 0.3260 g Sbst. g. 0.2578 g $BaSO_4$; S = 10.86%.
4. 0.1142 g Sbst. erf. n. Kj. 4.55 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4; N = 5.58%.
$$\frac{S}{N} = \frac{1}{1.18}.$$

Endlich lieferte auch die Bestimmung des Carbaminoquotienten im Filtratsulfat Werte, die von dem für das Niederschlagsulfat gefundenen abweichen.

[1]) M. Siegfried: Z. physiol. Chem. **43**, 363 (1904).

d) Der Carbaminoquotient $\frac{CO_2}{N}$.

Aus mehreren Proben Filtratsulfat wurde die Base isoliert und diese carbaminiert:

1. Gef. $CaCO_3$: 0.0922 g, verbr. 31.8 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4;
$$\frac{CO_2}{N} = \frac{1}{3.45}$$
2. Gef. $CaCO_3$: 0.0987 g, verbr. 29.9 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4;
$$\frac{CO_2}{N} = \frac{1}{3.03}$$

Die Werte der für das Filtratsulfat ermittelten Konstanten weichen also von den für das Niederschlagsulfat gefundenen ab.

8. Totale Hydrolyse des Filtratsulfates.

Hatten schon die für das Filtratsulfat ermittelten Formol- und van Slyke-N-Werte dafür gesprochen, daß dieses zum größten Teile aus intraprotein gebundenem Lysin besteht, so mußte ein weiterer Beweis dafür durch völlige Hydrolyse erbracht werden. Außerdem war es von Wichtigkeit, zu erfahren, ob das Filtratsulfat neben Lysin und Arginin auch Glutaminsäure liefern würde.

Ca. 2 g Filtratsulfat wurden mit 20 ccm 30%iger Schwefelsäure 12 Stunden lang am Rückflußkühler erhitzt. Die aus dem Hydrolysat in der üblichen Weise isolierte Base wurde mit Schwefelsäure neutralisiert und in Wasser zu 50 ccm gelöst.

a) Bestimmung des Formol-N.

1. 10 ccm Lösung verbr. 9.7 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH, verbr. n. Kj. 20.8 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4; Formol-N = 93.3% vom Ges.-N.
2. 10 ccm Lösung verbr. 9.9 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH, verbr. n. Kj. 21.1 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4; Formol-N = 93.8% vom Ges.-N.

b) Bestimmung des van Slyke-N.

Versuch	Angew. Lösung in ccm	Bar. in mm	Temp.	Dauer der Einwirkung der salpetr. Säure in Minuten	N_2 in ccm	ccm n 10 H_2SO_4	% Slyke-N vom Ges.-N.
I	10	748	20°	5	40,9	20,95	78,1
	10	748	20°	10	42,7	20,95	81,5
	10	748	20°	30	46,9	20,95	89,5
	10	748	20°	60	47,8	20,95	91,2
II	10	748	19°	5	40,9	20,95	78,5
	10	748	19°	10	42,8	20,95	82,1
	10	748	19°	30	47,4	20,95	90,9
	10	748	19°	60	48,0	20,95	92,1

Da das Hydrolysat des Filtratsulfates höhere Formol- und van Slyke-N-Werte aufweist als dieses selbst:

Mittelwerte für:	Filtratsulfat	Summe der Produkte der vollständigen Hydrolyse des Filtratsulfates
% Formol-N	76.1	93.6
% Slyke-N (10 Min. lange Einwirkung von salp. Säure)	64.5	81.8

so ist damit der Beweis erbracht, daß das Filtratsulfat in gleicher Weise wie das Niederschlagsulfat nicht aus einem bloßen Gemisch von Aminosäuren, sondern aus komplizierteren Körpern mit Peptid- oder anderen Bindungen besteht, die bei der totalen Hydrolyse gelöst werden und die Erhöhung der Formol- und van Slyke-N-Werte bedingen.

Im Gegensatz zum Niederschlagsulfat, bei dem der Gehalt an Arginin überwiegt, scheinen im Filtratsulfat die beiden

andern Aminosäuren: Lysin und Glutaminsäure vorzuherrschen. Die folgenden Versuche bestätigen die Richtigkeit dieser Vermutung.

c) Bestimmung der Menge des durch Phosphorwolframsäure fällbaren und nicht fällbaren Stickstoffs der Zersetzungsprodukte des Filtratsulfates.

3.2065 g Filtratsulfat wurden mit 30 ccm 30 %iger Schwefelsäure der totalen Hydrolyse unterworfen und das Reaktionsgemisch nach dem Erkalten mit Wasser auf 250 ccm aufgefüllt.

1. 5 ccm Lösung erf. n. Kj. 4.3 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.
2. 5 ccm Lösung erf. n. Kj. 4.2 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.
3. 10 ccm Lösung erf. n. Kj. 8.5 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Um die Verteilung des Stickstoffs im Filtratsulfat zu bestimmen, wurden 180 ccm seiner Zersetzungslösung auf eine 5 % freie Schwefelsäure enthaltende Lösung gebracht und mit 230 ccm einer 10 %igen Phosphorwolframsäurelösung gefällt. Das Gemisch wurde auf dem Wasserbade erwärmt und dann 12 Stunden stehen gelassen. Der Phosphorwolframsäureniederschlag wurde abfiltriert, mit 175 ccm 5 %iger Phosphorwolframsäure-Schwefelsäure ausgewaschen und mit Barythydrat in geringem Überschusse zersetzt. Im Filtrat vom Baryumphosphorwolframat wurde der Überschuß an Barythydrat durch Ammonkarbonat entfernt und das Filtrat vom Baryumkarbonat auf dem Wasserbade NH_3-frei eingedampft. Der Rückstand wurde im 100 ccm Kölbchen mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt („Lösung C"). Das Filtrat des Phosphorwolframsäureniederschlags wurde ebenso wie dieser behandelt („Lösung D"). Die Menge des durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoffs wurde in dieser Lösung nach der Siegfried-Hausmann'schen Methode bestimmt.

Die Korrektion für 1 Liter Mutterlauge wurde zu 18,6 ccm $\frac{n}{10}$ Schwefelsäure, für 1 Liter Waschflüssigkeit (5 %ige Phosphorwolframsäure-Schwefelsäure) zur Hälfte dieses Wertes bestimmt.

1. 5 ccm der „Lösung C“ erf. 4.2 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4 + Korr. 0.3 ccm = 4.5 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.
2. 10 ccm der „Lösung C“ erf. 8.6 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4 + Korr. 0.6 ccm = 9.2 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.
3. 10 ccm der „Lösung C“ erf. 8.7 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4 + Korr. 0.6 ccm = 9.3 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Mittel:

10 ccm der „Lösung C“ erf. : 9.2 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4,

100 ccm der „Lösung C“ erf. : 92.0 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Diese Anzahl ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4 stellt die Menge des in 180 ccm ursprünglicher Zersetzungslösung enthaltenen durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoffs dar.

180 ccm Zersetzungslösung erf. n. Kj. 153.0 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

100 ccm der „Lösung C“, entspr. 180 ccm Zersetzungslösung, erf. n. Kj. 92.00 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Mithin enthält das Filtratsulfat:

Durch PWS fällbaren Stickstoff = 60.1 % vom Ges.-N.

Dieser durch PWS fällbare Stickstoff verteilt sich auf Arginin und Lysin.

Der Silberbarytniederschlag von 5 ccm und je 10 ccm der „Lösung C“ erf. n. Kj. 1.7 bezw. 3.5 und 3.7 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4. Mittelwert: 3.4 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4 für den Silberbarytniederschlag von 10 ccm „Lösung C“.

Das Filtrat enthält also:

Arginin N = 22.9 %
Lysin N = 37.2 % } = 60.1 % durch PWS fällb. Stickstoff,
Glutaminsäure N = 39.8 %.

Durch die Ergebnisse der vorhergehenden Versuche läßt sich auch der folgende erklären:

1. 10 ccm der Zersetzungslösung des Filtratsulfates wurden nach der Silberbarytmethode behandelt. Der Niederschlag erf. n. Kj. 2.6 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, das Filtrat 6.0 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.
   N des Niederschlags = 30.2 % vom Gesamt-N.
2. 10 ccm der Zersetzungslösung ebenso behandelt: Der Niederschlag erf. n. Kj. 2.3 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4, das Filtrat 6.2 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.
   N des Niederschlags = 27.1 % vom Gesamt-N.

Wie bei den entsprechenden mit dem Niederschlagsulfat angestellten Versuchen (S. 48) ist auch hier ein Teil der Glutaminsäure in den Silberbarytniederschlag übergegangen.

Die Glutaminsäure selbst konnte in Form ihres Chlorhydrates aus der „Lösung D“ (S. 55) isoliert werden. Ausbeute ca. 0.6 g.

Analysen:

1. 0.1644 g Sbst. g. 0.1302 g AgCl; Cl = 19.59 %.
2. 0.1533 g Sbst. g. 0.1208 g AgCl; Cl 19.49 %.
   Ber. für $C_5H_9NO_4 \cdot HCl$: Cl = 19.32 %.

Schließlich galt es noch, zu untersuchen, ob die Glutaminsäure im Filtratsulfat in gleicher Weise wie beim Niederschlagsulfat im Molekül enthalten ist.

Zu diesem Zwecke wurde die Lösung von ca. 2 g Filtratsulfat mit Phosphorwolframsäure ausgefällt und die aus diesem Niederschlag erhaltene Substanz der völligen Hydrolyse unterworfen. Im übrigen wurde der Versuch ebenso weiter durchgeführt, wie früher (S. 49) beim Niederschlagsulfat angegeben worden ist. Auch hier konnte Glutaminsäure in Form des Chlorhydrates durch Chlorbestimmung festgestellt werden. Ausbeute ca. 0.5 g.

Analysen:

1. 0.2013 g Sbst. g. 0.1593 g AgCl; Cl = 19.58 %.
2. 0.2118 g Sbst. g. 0.1688 g AgCl; Cl = 19.72 %.

Ber. für $C_5H_9NO_4 \cdot HCl$: Cl = 19.32 %.

Aus der Untersuchung des Filtratsulfates ergibt sich, daß dieses zwar die gleichen Spaltungsprodukte bei der völligen Hydrolyse liefert wie das Niederschlagsulfat, daß es aber mit letzterem nicht identisch ist. Dadurch ist die eine der bestehenden Möglichkeiten, daß Silberbaryt auf β-Glutokyrinsulfat derart einwirke, daß dieses als in gesättigtem Barytwasser schwer- aber nicht unlösliches Silbersalz niedergeschlagen werde, ausgeschlossen. Durch die Anwendung der Silberbarytmethode auf das β-Glutokyrinsulfat erleidet dieses vielmehr eine Spaltung, die in den vom Ausgangsmaterial verschiedenen Konstanten der Fraktionen zum Ausdruck kommt, die aber nicht als vollständig betrachtet werden kann, da die drei Aminosäuren, aus denen das β-Glutokyrinsulfat besteht, sich auch in den Molekülen der Fraktionen durch Peptid- oder andere Bindungen vereinigt finden.

III. TEIL.

Die Einwirkung von 25%iger Salzsäure (mit und ohne Zinnchlorür) und von 25%iger Schwefelsäure auf das β-Glutokyrin.

1. Geschichtliches über das Lysatinin.

E. Drechsel[1]) gelang es zuerst nach der Behandlung von Kasein mit Zinnchlorür und Salzsäure aus der Zersetzungslösung neben Lysin und Diaminoessigsäure eine Base zu isolieren, die er Lysatinin benannte. Da sie bei der Behandlung mit Baryt Harnstoff lieferte, sprach er sie für ein Homologes des Kreatins an. Dieselbe Base wurde später von Siegfried,[2]) Schwarz[3]) u. a. nach einer von der Drechsel'schen abweichenden Methode auch aus anderen Proteinkörpern sowie aus tryptischen Verdauungsprodukten in Form ihres Silbersalzes dargestellt. Gleichwohl hat Hedin[4]), obwohl er bei der Darstellung der Base von dem von Siegfried angegebenen Verfahren abwich, dem Lysatinin den Charakter eines chemischen Individuums abgesprochen und das Lysatininsilbersalz für ein aus Lysin- und Argininsalz bestehendes Gemenge gehalten.

Bei den daraufhin von Siegfried[5]) angestellten Versuchen, gleiche Mengen von Lysin- und Argininsilbernitrat zur Kristallisation zu bringen, wurden zunächst nur Schmieren und

[1]) Ber. der Sächs. Ges. der Wiss., math. nat. Kl. **42**, 322 (1890). Archiv für Anatomie u. Physiol. 1891, S. 248.

[2]) Berl. Ber. **24**, 418 (1891).

[3]) Schwarz: Z. physiol. Chem. **18**, 487 (1893).

[4]) Hedin: ibid. **20**, 186 (1894).
Hedin: ibid. **21**, 155 u. 297 (1895).

[5]) M. Siegfried: ibid. **35**, 192 (1902).

erst durch Zusatz von viel Äther Kristalle erhalten, die sich aber durch ihren höheren Gehalt an Silber wesentlich von denen des Lysatininsilbersalzes unterschieden. Siegfried hat daher der Hedin'schen Annahme, daß dieses Salz ein Gemenge von Lysin- und Argininsilbersalz oder ein in festen Verhältnissen kristallisierendes Doppelsalz dieser Basen sei, nicht beipflichten können.

Da das Lysatinin nur bei der Spaltung mit Zinnchlorür + Salzsäure, nicht aber bei der mit Schwefelsäure auftritt, so kann es nach Siegfried vielleicht auch als ein sekundäres Umwandlungsprodukt betrachtet werden.

Solange es nicht gelungen ist, die freie Base oder ihr Chlorhydrat zu isolieren und ihre Verschiedenheit von den Hexonbasen festzustellen, kann die Frage, ob das Lysatinin als ein einheitlicher Körper zu betrachten sei, weder in dem einen noch in dem andern Sinne beantwortet werden.

Das aus Wittepepton von Siegfried[1]) bereitete Antipepton α lieferte unter den Spaltungsprodukten auch Lysatinin, das aber von demselben Verfasser aus dem aus Leim hergestellten Antipepton nicht gewonnen werden konnte. Dagegen gelang es Ernst Fischer[2]), aus dem Leim selbst, den er nach der Methode von Hlasiwetz und Habermann mit Zinnchlorür + Salzsäure gespalten hatte, die Drechsel'sche Base in Form ihres Silbersalzes zu isolieren.

Es war daher von Interesse zu erfahren, ob die Darstellung des Lysatinins auch aus der Peptonfraktion des Leims, wie sie das Glutokyrin darstellt, gelingen möchte.

Nimmt man das Ausgangsmaterial aus je 1 Mol. Arginin, Lysin und Glutaminsäure bestehend an, so könnte es möglich sein, daß sich bei Einwirkung von Phosphorwolframsäure auf

[1]) M. Siegfried: Über Antipepton: Z. physiolog. Chem. **35**, 180 (1902).

[2]) Archiv für Anat. u. Physiol., Jahrg. 1891, S. 265.

die aus Glutokyrin durch Behandlung mit Zinnchlorür + Salzsäure erhaltene Zersetzungslösung das Lysatinin aus dem Phosphorwolframsäure-Niederschlage isolieren ließe.

2. Spaltung von β-Glutokyrin mit Zinnchlorür + Salzsäure und Isolierung der Base aus dem Phosphorwolframsäure-Niederschlag.

a) Darstellung und Untersuchung ihres Silbersalzes.

Aus 8.2650 g Glutokyrin-β-sulfat (II) wurde in der üblichen Weise die Base dargestellt und diese mit 10 g Zinnchlorür 50 g Salzsäure (25 %) und 10 g Wasser 5 Stunden lang am Rückflußkühler erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 400 ccm Wasser verdünnt und das Zinn durch Einleiten von Schwefelwasserstoff entfernt. Das Filtrat vom Zinnsulfür wurde auf dem Wasserbad auf 200 ccm eingeengt und dann mit 10 %iger Phosphorwolframsäurelösung gefällt. Der mit 5 %iger Phosphorwolframsäure-Schwefelsäure ausgewaschene Niederschlag wurde in Wasser von 40° fein verrieben, die Phosphorwolframsäure durch Barythydrat gefällt und der geringe Überschuß an letzterem durch Ammonkarbonat entfernt. Das Filtrat vom Baryumkarbonat wurde auf dem Wasserbade NH_3-frei eingedampft und der Rückstand mit Wasser zu 250 ccm gelöst.

160 ccm der stark alkalisch reagierenden Lösung wurden bis zur zähen Sirupskonsistenz eingedampft und mit 5.46 ccm n. Salpetersäure neutralisiert (Lackmus). Von der erforderlichen Menge Silbernitrat (= 0.9276 g) wurde zunächst nur 0.4714 g zugesetzt und das Gemisch 12 Stunden stehen gelassen. Da nach Verlauf dieser Zeit nur eine Abscheidung von Schmieren erfolgte, wurde der Rest des berechneten Silbernitrats zugefügt. Nach Behandlung mit Alkohol und Äther erfolgte die Abscheidung des Silbersalzes, das über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet wurde. Die Ausbeute betrug 1.1 g.

Das Salz bestand aus schneeweißen feinen silberglänzenden Nadeln, die in Wasser leicht löslich waren und aus dieser Lösung durch Alkohol und besser noch durch einen weiteren Zusatz von Äther wieder gefällt wurden. Auch die schon von Drechsel und den andern Verfassern beobachtete Eigenschaft, sich selbst bei der Aufbewahrung im Dunkeln allmählich rötlich und dunkel zu färben, zeigte das Salz. Schon dieser Umstand machte es wahrscheinlich, daß tatsächlich das Silbersalz des Lysatinins und nicht ein Gemenge von Arginin- und Lysinsilbersalz vorlag, dem die erwähnte Eigenschaft nicht zukommt.

Elementaranalysen:

Zur Untersuchung gelangte das zweimal umkristallisierte Silbersalz:

1. 0.1310 g Sbst. g. bei 746 mm Bar. u. 18° C.: 20.96 ccm tr. N_2; N = 18.4 %.
2. 0.1022 g Sbst. g. 0.0283 g Ag; Ag = 27.7 %.

Mikroanalyse nach Pregl:[1])

1. 10.635 mg Sbst. g. 2.916 mg Ag; Ag = 27.4 %.

Die Werte entsprechen den für Lysatininsilber berechneten:

	Gef. %	Ber. % für $C_6H_{13}N_3O_2 . HNO_3 . AgNO_3$
Ag	27.7; 27.4	27.5
N	18.4	17.9

b) Der Carbaminoquotient $\frac{CO_2}{N}$.

Die aus 3 g Glutokyrin-β-sulfat isolierte Base wurde mit 5 g Zinnchlorür, 45 ccm Salzsäure (25 %) und 5 ccm Wasser 5 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht. In der mit Wasser

[1]) Fritz Pregl: Die quantitative Elementaranalyse organischer Substanzen: Abderhalden, Biochem. Arbeitsmethoden, Bd. V, 2, S. 1307 ff. (1912).

verdünnten Lösung wurde zunächst das Zinn durch Schwefelwasserstoff und im Filtrat des Zinnsulfürs letzterer entfernt. Der mit Phosphorwolframsäure bewirkte Niederschlag wurde in Wasser verteilt, durch Barythydrat zersetzt und der geringe Überschuß an letzterem durch Ammonkarbonat entfernt. Der auf dem Wasserbad NH_3-frei eingedampfte Rückstand wurde in Wasser zu 100 ccm gelöst.

1. 30 ccm Lösung wurden mit 120 ccm Wasser verdünnt und carbaminiert:

   Gef. $CaCO_3$: 0.1074 g, verbr. 26.2 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4;

   $$\frac{CO_2}{N} \quad \frac{1}{2.44}.$$

2. 30 ccm Lösung wurden mit 120 ccm Wasser verdünnt und carbaminiert:

   Gef. $CaCO_3$: 0.1066 g, verbr. 26.4 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4;

   $$\frac{CO_2}{N} = \frac{1}{2.48}.$$

Setzt man den Fall, die Base sei ein Gemenge von gleichviel Molekülen Arginin und Lysin, so müßte sie einen Carbaminoquotienten gleich $\frac{1}{2}$ liefern; nimmt man dagegen an, daß die Base kein bloßes Gemisch, sondern eine nach Art der Fischer'schen Peptide zusammengesetzte Verbindung von Arginin und Lysin in äquimolekularen Verhältnissen darstellt, so wäre für $\frac{CO_2}{N}$ ein Wert von $\frac{1}{3}$ zu erwarten. Der tatsächlich gefundene Carbaminoquotient $\frac{1}{2.46}$ stimmt also mit keinem der berechneten überein. Nimmt man aber an, daß in der Base zwischen Arginin und Lysin peptidartige Bindungen bestehen, die ebenfalls gegen Kohlensäure reagieren, so würde sich der gefundene Wert für den Carbaminoquotienten ebenso erklären lassen, wie der für das Glutokyrin ebenfalls zu groß gefundene Wert für $\frac{CO_2}{N}$.

c) Bestimmung des Formol-N:

Ebenfalls wie beim Glutokyrin wurde auch hier ein etwas höherer Formol-N-Wert erhalten, als er sich nach der Berechnung aus dem Carbaminoquotienten ergeben müßte.

10 ccm obiger Lösung zur Formoltitration verwandt. Nach Zusatz von 15 ccm Formolmischung verbraucht 3.8 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH. Verbraucht nach Kj. 17.5 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Formol-N = 43.4 % vom Gesamt-N.

Sprach schon der Umstand, daß die Base beim Carbaminieren einen niedrigeren Wert für $\frac{CO_2}{N}$ gab, als den berechneten, dagegen, daß sie ein Gemisch der beiden erwähnten Hexonbasen sei, so sollte versucht werden, mit Hilfe der Kossel'schen Silberbarytmethode einen weiteren Beweis dafür zu erbringen, daß die Base kein Gemenge von Arginin und Lysin sein kann.

d) Weiterbehandlung der Base nach der Silberbarytmethode.

Der Rest obiger Lösung (30 ccm) wurde nach der Silberbarytmethode behandelt, der Niederschlag nicht abfiltriert, sondern 3 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, die Base dann in der üblichen Weise isoliert und in Wasser zu 50 ccm gelöst.

Zirka 40 ccm der so erhaltenen Lösung wurden mit 150 ccm Wasser verdünnt und carbaminiert.

Gef. $CaCO_3$: 0.0568 g, verbr. 18.6 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4;

$$\frac{CO_2}{N} = \frac{1}{3.27}.$$

Der Versuch lehrt, daß die Base durch die Einwirkung von Silberbaryt eine Spaltung erfahren hat, die ihren Ausdruck in der Änderung des Carbaminoquotienten findet.

Daß auch hier, wie es bei der Einwirkung von Silberbaryt auf das Glutokyrin der Fall war, nicht die erwartete

Vergrößerung des Quotienten eintrat, läßt sich gleichfalls damit begründen, daß diejenigen Anteile, die einen hohen Quotienten liefern, bei der Carbaminierung im ersten Kalkniederschlag bleiben.

Auch die Erhöhung des Formol-N-Wertes nach Behandlung der Base mit Silberbaryt beweist, daß eine Spaltung der letzteren stattgefunden hat. Der erhaltene Wert kommt dem berechneten nahe.

10 ccm obiger Lösung verbraucht. nach Zusatz von 15 ccm Formolmischung 2.0 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH und nach Kjeldahl 8.2 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Formol-N = 48.8% vom Gesamt-N.

Die Ergebnisse der vorigen Versuche lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: Aus der durch die Einwirkung von Zinnchlorür + Salzsäure auf das β-Glutokyrin erhaltenen Hydrolysenlösung läßt sich eine Substanz isolieren, deren Silbernitratdoppelsalz in bezug auf seinen Stickstoff- und Silbergehalt dem von Drechsel u. a. dargestellten Lysatininsilber gleich kommt. Die erhaltene Base ist nicht als ein Gemisch von Arginin und Lysin, sondern als eine chemische Verbindung dieser Aminosäuren zu betrachten, denn sie erfährt durch die Einwirkung von Silberbaryt nach Kossel eine Spaltung, die sowohl mit Hilfe der Carbaminoreaktion als auch durch die Formoltitrierung nachgewiesen werden kann.

Die Versuche, die wegen Mangels an Ausgangsmaterial abgebrochen werden mußten, sollen später fortgeführt werden, zumal, da ihre Ergebnisse zu der Hoffnung berechtigen, daß es gelingen wird, von den Eiweißkörpern auf dem Wege über die Kyrine zu dem viel umstrittenen Lysatinin zu gelangen.

3. Einwirkung von 25%iger Salzsäure (ohne Zinnchlorür) auf Glutokyrin-β-sulfat.

Mit der Ausführung der folgenden Versuche wurde bezweckt, festzustellen, ob schon durch die Einwirkung von 25%iger Salzsäure (ohne Zinnchlorür) auf Glutokyrin-β-sulfat auf eine

Bildung von Lysatinin geschlossen werden darf. Im zutreffenden Falle müßte das Hydrolysat einen höheren Formol-N-Wert wie das Glutokyrin-β-sulfat, aber einen niedrigeren als die Summe der Spaltungsprodukte, die bei der totalen Hydrolyse des Glutokyrins mit 50%iger Schwefelsäure erhalten werden, aufweisen. Auch an dem Werte des Carbaminoquotienten würde sich die Bildung von Lysatinin zu erkennen geben.

Ca. 1.5 g Glutokyrin-β-sulfat (3. Darst.) wurden mit der 10fachen Menge 25%iger Salzsäure 10 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht, auf dem Wasserbade die Hauptmenge der Salzsäure verjagt, das Hydrolysat mit Natronlauge neutralisiert und mit Wasser auf 50 ccm aufgefüllt.

a) Bestimmung des Formol-N.

1. 10 ccm Lösung verbr. n. Zusatz von 15 ccm Formolmischung 9.1 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH, verbr. n. Kj. 32.6 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

   Formol-N = 55.8% vom Gesamt-N.

2. 10 ccm Lösung verbr. n. Zusatz von 15 ccm Formolmischung 9.3 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH, verbr. n. Kj. 32.5 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

   Formol-N = 57.2% vom Gesamt-N.

b) Bestimmung des van Slyke-N.

Versuch	Angew. Lösung in ccm	Bar. in mm	Temp.	Dauer der Einwirkung der salpetr. Säure in Minuten	N_2 in ccm	ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4	% Slyke-N vom Ges.-N.
I	10	762	18°	5	27,9	32,6	35,2
	10	762	18°	10	37,2	32,6	47,0
	10	762	18°	30	45,3	32,6	57,2
	10	762	18°	60	45,9	32,6	57,9
II	9	762	17°	5	25,0	29,3	35,3
	9	762	17°	10	33,6	29,3	47,4
	9	762	17°	30	40,9	29,3	57,7
	9	762	17°	60	41,4	29,3	58,4

c) Der Carbaminoquotient $\frac{CO_2}{N}$.

Die Carbaminierung der aus dem Glutokyrin-β-sulfat nach Behandlung mit 25%iger Salzsäure erhaltenen Base lieferte folgende Werte:

$CaCO_3$: 0.1686 g; $\frac{n}{10}$ H_2SO_4: 31.1 ccm; $\frac{CO_2}{N} = \frac{1}{1.84}$.

Da die oben erhaltenen Werte für die Konstanten sich denen nähern, die bei der totalen Hydrolyse des Glutokyrins mit 30%iger Schwefelsäure erhalten wurden (S. 23), so ist damit der Beweis geliefert, daß eine Bildung von Lysatinin durch Einwirkung von 25%iger Salzsäure auf Glutokyrin nicht stattfindet.

4. Einwirkung von 25%iger Schwefelsäure auf Glutokyrin-β-sulfat.

Ca. 1 g Glutokyrin-β-sulfat wurde mit der 10fachen Menge 25%iger Schwefelsäure 10 Stunden am Rückflußkühler erhitzt. Die aus der Spaltungslösung in der üblichen Weise isolierte Base wurde carbaminiert.

1. Gef. $CaCO_3$: 0.1262 g; $\frac{n}{10}$ H_2SO_4: 22.6 cm; $\frac{CO_2}{N} = \frac{1}{1.79}$.

2. Gef. $CaCO_3$: 0.1324 g; $\frac{n}{10}$ H_2SO_4: 23.2 ccm; $\frac{CO_2}{N} = \frac{1}{1.75}$.

Die gefundenen Werte deuten darauf hin, daß die Behandlung des Glutokyrin-β-sulfates mit 25%iger Schwefelsäure einer totalen Hydrolyse (S. 23) gleichzuachten und eine Bildung von Lysatinin als Zwischenprodukt nicht anzunehmen ist.

IV. TEIL.

Sind in dem Filtrate der Phosphorwolframsäurefällung des Rohkyrins noch intermediäre Eiweißspaltungsprodukte vorhanden, oder nur völlig abgespaltene Aminosäuren?

Das Filtrat des Rohkyrinphosphorwolframates ist bisher zum Gegenstand näherer Untersuchungen nicht gemacht worden.

Da mit Hilfe der Sörensen'schen Formoltitrierung und der van Slyke'schen Methode die Möglichkeit gegeben ist, festzustellen, eine wie weitgehende Spaltung der Gelatine durch die Einwirkung der $12^1/_2\,^0/_0$igen HCl erfolgt ist, wurden diese beiden Methoden auf das Filtrat des Rohkyrinphosphorwolframates angewandt. Dagegen wurde, da von vornherein angenommen werden mußte, daß das Filtrat des Rohkyrinphosphorwolframates nicht als Lösung eines einheitlichen, sondern als eines aus den Spaltungsprodukten des Leims in verschiedenen Mengenverhältnissen bestehenden Körpers zu betrachten sei, von der Bestimmung des Carbaminoquotienten Abstand genommen.

Die Menge des Filtrates vom Rohkyrinphosphorwolframat betrug einschließlich der verwandten Waschwässer 27 Liter. 3 Liter des gut gemischten Filtrates — entsprechend 55 g der zur Zersetzung angewandten Gelatine — wurden mit Barythydrat bis zur alkalischen Reaktion versetzt, der Überschuß an letzterem durch Schwefelsäure beseitigt und das Filtrat auf das ursprüngliche Volumen eingedampft.

a) Bestimmung des Formol-N.

1. 20 ccm Lösung neutr. mit conc. Natronlauge, erf. nach Zusatz von 15 ccm Formolmischung 10.1 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH, verbr. n. Kj. 27.0 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

   Formol-N = 74.8 % vom Gesamt-N.

2. 20 ccm Lösung, ebenso behandelt, erf. 9.9 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH, verbr. n. Kj. 26.6 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

   Formol-N = 74.4 % vom Gesamt-N.

b) Bestimmung des van Slyke-N.

Versuch	Angew. Lösung in ccm	Bar. in mm	Temp.	Dauer der Einwirkung der salpetr. Säure in Minuten	N_2 in ccm	ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4	% Slyke-N vom Ges.-N
I	10	748	19°	5	3,7	13,4	11,1
	10	748	19°	10	14,1	13,4	42,3
	10	748	19°	30	20,6	13,4	61,8
	10	748	19°	60	21,6	13.4	64,8
II	10	748	20°	5	3,9	13,4	11,6
	10	748	20°	10	14,4	13,4	43,0
	10	748	20°	30	20,8	13,4	62,1
	10	748	20°	60	21,9	13,4	65,4

Totale Hydrolyse des Filtrates vom Rohkyrinphosphorwolframat.

50 ccm vom Filtrat des Rohkyrinphosphorwolframates wurden mit 50 ccm 25 %iger Salzsäure 10 Stunden lang am Rückflußkühler erhitzt. Nach beendeter Reaktion wurde das Hydrolysat durch Eindampfen auf dem Wasserbad von der Hauptmenge der Salzsäure befreit und nach dem Erkalten mit konzentrierter Natronlauge neutralisiert. Von den ab-

geschiedenen Huminsubstanzen wurde abfiltriert und das Filtrat mit Wasser auf ein Volumen von 50 ccm gebracht.

a) Bestimmung des Formol-N.

1. 10 ccm Lösung erf. nach Zusatz von 15 ccm Formolmischung 6.3 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH, verbr. n. Kj. 12.8 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.
   Formol-N = 98.4 % vom Gesamt-N.
2. 10 ccm Lösung, ebenso behandelt, erf. 6.0 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH, verbr. n. Kj. 12.4 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.
   Formol-N = 96.8 % vom Gesamt-N.

b) Bestimmung des van Slyke-N.

Versuch	Angew. Lösung in ccm	Bar. in mm	Temp.	Dauer der Einwirkung der salpetr. Säure in Minuten	N_2 in ccm	ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4	% Slyke-N vom Ges.-N.
I	10	748	19°	5	14,2	12,6	45,3
	10	748	19°	10	20,5	12,6	65,4
	10	748	19°	30	28,4	12,6	90,6
	10	748	19°	60	29,9	12,6	95,4
II	10	748	18°	5	14,5	12,6	46,5
	10	748	18°	10	20,8	12,6	66,7
	10	748	18°	30	28,6	12,6	91,7
	10	748	18°	60	29,9	12,6	95,8

Da sowohl die Formol- als auch die van Slyke-N-Werte im Hydrolysat höhere sind als in der Ausgangslösung, so ist das Filtrat des Rohkyrinphosphorwolframates nicht lediglich als ein Gemisch von Aminosäuren zu betrachten, sondern es muß vielmehr angenommen werden, daß diese zu kleineren oder größeren Komplexen durch Peptid- oder andere Bindungen vereinigt sind.

ANHANG.

Zum Vergleiche mit den beim Glutokyrin gewonnenen Werten wurden für verschiedene Peptone diese Werte bestimmt, soweit sie nicht früher bereits festgelegt waren.

1. Trypsinfibrinpepton-α.[1])

0.6324 g im Siegfried'schen Trockenapparat getrocknetes Trypsinfibrinpepton-α wurden in Wasser zu 50 ccm gelöst.

a) Bestimmung des Formol-N.

1. 10 ccm Lösung erf. n. Zus. von 15 ccm Formolmischung 3.6 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH, verbr. n. Kj. 14.6 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.
   Formol-N = 49.3 % vom Gesamt-N.
2. 10 ccm Lösung erf. n. Zus. von 15 ccm Formolmischung 3.8 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH, verbr. n. Kj. 14.7 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.
   Formol-N = 51.7 % vom Gesamt-N.

b) Bestimmung des van Slyke-N.

Angew. Lösung in ccm	Bar. in mm	Temp.	Dauer der Einwirkung von salpetr. Säure in Minuten	N_2 in ccm	ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4	% Slyke-N vom Ges.-N.
10	755	15°	5	8,6	14,65	24,2
10	755	15°	10	10,2	14,65	28,8
10	755	15°	30	11,2	14,65	31,6
10	755	15°	60	13,6	14,65	38,3

[1]) M. Siegfried: Z. physiol. Chem. **35**, 164 (1902); ibid. **38**, 259 (1903). — Fr. Müller: ibid. **38**, 265 (1903). — W. Neumann: ibid. **45**, 216 (1905). — E. Hitzschmann: Zur Kenntnis der Trypsinfibrinpeptone. Diss. Leipzig (1907). — K. Adler: Diss. Leipzig (1907).

c) Der Carbaminoquotient $\frac{CO_2}{N}$.

Der Carbaminoquotient wurde bereits früher zu $\frac{1}{2.3}$ bestimmt.

d) Der Azylquotient $\frac{S}{N}$.

1.0244 g Trypsinfibrinpepton-α wurden in 3.95 ccm Normalnatronlauge gelöst und mit der ätherischen Lösung von 1.7912 g β-Naphtalinsulfochlorid geschüttelt. Weiterhin dreimal je 3.95 ccm Normalnatronlauge zugesetzt und insgesamt vier Stunden geschüttelt. Weiterbehandlung in der üblichen Weise. Ausbeute der über Schwefelsäure im Vakuum getrockneten Naphtalinsulfoverbindung 0.8 g.

Analysen:

1. 0.3472 g Sbst. gaben 0.2651 g $BaSO_4$;
2. 0.1153 g Sbst. erf. n. Kj. 5.86 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

$$\frac{S}{N} = \frac{1}{1.19}.$$

2. Trypsinfibrinpepton-β.[1])

1.003 g Trypsinfibrinpepton-β (getrocknet im Siegfried'schen Trockenapparat bis zum konstanten Gewicht) wurden in Wasser zu 50 ccm gelöst.

a) Bestimmung des Formol-N.

1. 10 ccm Lösung erf. nach Neutralisation mit Natronlauge und Zusatz von 15 ccm Formolmischung 3.6 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH, verbr. n. Kj. 22.4 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Formol-N = 32.1 % vom Gesamt-N.

[1]) M. Siegfried: Z. physiol. Chem. **35**, 164 (1902); ibid. **38**, 259 (1903). — Fr. Müller: ibid. **38**, 265 (1903). — E. Hitzschmann: Zur Kenntnis der Trypsinfibrinpeptone. Dissertation Leipzig 1907. — W. Neumann: Z. physiol. Chem. **45**, 216 (1905).

2. 10 ccm Lösung, ebenso behandelt, erf. 3.6 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH, verbr. n. Kj. 22.2 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

Formol-N = 32.4 % vom Gesamt-N.

b) Bestimmung des van Slyke-N.

Angew. Lösung in ccm	Bar. in mm	Temp.	Dauer der Einwirkung der salpetr. Säure in Minuten	N_2 in ccm	ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4	% Slyke-N vom Ges.-N.
10	755	14°	5	8,6	22,3	16,0
10	755	14°	10	10,2	22,3	19,0
10	755	14°	30	12,2	22,3	22,7
10	755	14°	60	14,2	22,3	26,4

c) Der Carbaminoquotient $\frac{CO_2}{N}$.

Da der Wert für $\frac{CO_2}{N}$ bereits früher zu $\frac{1}{2.15}$ ermittelt worden ist, wurde von seiner Bestimmung abgesehen.

d) Der Azylquotient $\frac{S}{N}$.

1.0566 g Trypsinfibrinpepton-β wurde mit der ätherischen Lösung von 1.7665 g β-Naphtalinsulfochlorid und insgesamt 15.6 ccm n Natronlauge 6 Stunden geschüttelt. Die Ausbeute des aus der alkalischen Lösung durch verdünnte Salzsäure ausgeschiedenen und über Schwefelsäure im Vakuum bis zum konstanten Gewicht getrockneten Derivates betrug 0.8 g.

1. 0.2984 g Sbst. g. nach Verschmelzen mit Natriumhydroxyd und Salpeter 0.2004 g $BaSO_4$.
2. 0.1994 g Sbst. erf. n. Kj. 6.1 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4

$$\frac{S}{N} \quad \frac{1}{1.06}.$$

3. Pepsinfibrinpepton-β.[1])

2.0084 g bis z. k. Gew. im Siegfried'schen Trockenapparat getrocknetes Pepsinfibrinpepton-β wurden in Wasser zu 100 ccm gelöst. Die erhaltene Lösung wurde zur Carbaminoreaktion, Formol- und van Slyke-Stickstoffbestimmung verwendet.

a) Bestimmung des Formol-N.

1. 10 ccm der mit NaOH neutralisierten Lösung erf. n. Zus. von 15 ccm Formolmischung: 3.4 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH, verbr. n. Kj. 22.4 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.
   Formol-N = 30.4 % vom Gesamt-N.
2. 10 ccm Lösung, ebenso behandelt, erf. 3.6 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH, verbr. n. Kj. 22.3 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.
   Formol-N = 32.3 % vom Gesamt-N.

b) Bestimmung des van Slyke-N.

Angew. Lösung in mm	Bar. in mm	Temp.	Dauer der Einwirkung der salpetr. Säure in Minuten	N_2 in ccm	ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4	% Slyke-N vom Ges.-N
10	753	15°	5	12,0	22,35	22,1
10	753	15°	10	12,6	22,35	23,2
10	753	15°	30	14,8	22,35	27,3
10	753	15°	60	16,6	22,35	30,6

c) Der Carbaminoquotient $\frac{CO_2}{N}$.

1. 50 ccm der Lösung gaben $CaCO_3$: 0.0485 g, verbr. n. Kj. 16.5 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_5; $\frac{CO_2}{N} = \frac{1}{3.4}$.

[1]) P. Mühle: Versuch zur Reindarstellung des Amphopeptons. Diss. Leipzig 1902. — M. Siegfried: Z. physiol. Chem. 38, 262 (1903). — C. Borkel: ibid 38, 289 (1903).

2. 1.1633 g Pepsinfibrinpepton-β gaben nach der Carbaminierung $CaCO_3$: 0.0565 g, verbr. n. Kj. 18.75 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4; $\frac{CO_2}{N} = \frac{1}{3.32}$.

d) Der Azylquotient $\frac{S}{N}$.

1.1237 g Pepsinfibrinpepton-β wurde mit der ätherischen Lösung von 0.9566 g β-Naphtalinsulfochlorid und insgesamt 8.5 ccm n. Natronlauge 6 Stunden geschüttelt. Weiterbehandlung in der üblichen Weise. Ausbeute: 0.9 g.

1. 0.4450 g Sbst. g. nach Verschmelzen mit Natriumhydroxyd und Salpeter 0.3711 g $BaSO_4$.
2. 0.1933 g Sbst. erf. n. Kj. 12.0 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

$$\frac{S}{N} = \frac{1}{1.74}.$$

4. Trypsinkaseinpepton. [1])

1.1540 g Trypsinkaseinpepton (10 Tage lang im Siegfried'schen Apparat getrocknet) gelöst in Wasser zu 50 ccm.

a) Bestimmung des Formol-N.

1. 10 ccm Lösung neutralisiert mit conc. NaOH (Lackmus) erf. nach Zusatz von 15 ccm Formolmischung: 3.6 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH.

   Nach Kj. verbr. 23.7 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

   Formol-N = 30.38 % vom Gesamt-N.
2. 10 ccm Lösung, ebenso behandelt, erf. 3.7 ccm $\frac{n}{5}$ NaOH nach Kj. verbr. 23.7 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4.

   Formol-N = 31.22 % vom Gesamt-N.

[1]) Beiträge zur Kenntnis der Trypsinwirkung: Über die tryptische Verdauung des Kaseins. M. Siegfried und O. Lindner: Arch. f. d. ges. Phys., Bd. 136 (Bonn 1910).

b) Bestimmung des van Slyke-N.

Angew. Lösung in ccm	Bar. in mm	Temp.	Dauer der Einwirkung der salpetr. Säure in Minuten	N_2 in ccm	ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4	% Slyke-N vom Ges.-N.
10	753	15°	5	13,8	23,7	24,0
10	753	15°	10	15,6	23,7	27,1
10	753	15°	30	17,2	23,7	29,9
10	753	15°	60	19,2	23,7	33,4

c) Der Carbaminoquotient $\frac{CO_2}{N}$.

Der Carbaminoquotient $\frac{CO_2}{N}$ war bereits von früheren Verfassern zu $\frac{1}{2.36}$ bestimmt worden.

d) Der Azylquotient $\frac{S}{N}$.

1.0246 g Trypsinkaseinpepton mit der ätherischen Lösung von 4 g Naphtalinsulfochlorid und 40 ccm n. Natronlauge geschüttelt. Beim Übersättigen der alkalischen Lösung mit Salzsäure erfolgte eine nur geringe Abscheidung einer braunen verschmierenden Verbindung, von deren Untersuchung Abstand genommen werden mußte.

C. Ergebnisse der Untersuchung.

1. Durch die in Übereinstimmung mit früheren Versuchen für das Glutokyrin-β-sulfat gefundenen Werte des Carbaminoquotienten, der Elementaranalyse und des Gehaltes an Formol-N wurde von neuem gezeigt, daß das Glutokyrin-β-sulfat ein Körper von einheitlicher Zusammensetzung ist.

2. Als neue Konstanten zur Charakterisierung des Glutokyrin-β-sulfates wurde sein Gehalt an van Slyke-N und der „Azylquotient" $\frac{S}{N}$ ermittelt.

3. Durch die Einwirkung von Silbersulfat und Baryumhydroxyd erleidet das Glutokyrin-β-sulfat eine Spaltung.

4. Bei dieser Spaltung werden nicht freie Aminosäuren gebildet, sondern noch zusammengesetzte Spaltungsprodukte, die in zwei Fraktionen sich trennen lassen, von denen die eine hauptsächlich Arginin und wenig Glutaminsäure, die andere Lysin und Glutaminsäure und wenig Arginin bei der Totalhydrolyse liefert.

5. Es wurde festgestellt, daß die Spaltung des Glutokyrins mit Zinnchlorür und Salzsäure anders verläuft als die mit Salzsäure ohne Zinnchlorür.

6. Während im Gegensatz zu früheren Angaben das Sarkosin als formoltitrierbar erkannt wurde, erwies es sich gegenüber der Einwirkung von salpetriger Säure nach van Slyke als reaktionslos.

7. Im Widerspruch mit den früher von anderer Seite gemachten Angaben wurde festgestellt, daß von den vier

Stickstoffatomen des Arginins nicht nur eins, sondern zwei mit β-Naphtalinsulfochlorid in Reaktion treten.

8. Anhangsweise wurden Konstanten der Peptone: Pepsinfibrinpepton-β, Trypsinfibrinpepton-α und -β, Trypsinkaseinpepton ermittelt.

Lebenslauf.

Ich, Walter Schunke, ev.-luth. Konfession, wurde am 3. September 1880 als Sohn des Lehrers a. D. Gustav Schunke zu Halle (Saale) geboren, besuchte nach zuvor erhaltenem Elementarunterricht das Stadtgymnasium dortselbst und verließ es mit dem Reifezeugnis für Prima, um mich dem Apothekerberuf zu widmen. Nach dreijähriger Lehrzeit in der Löwenapotheke zu Halle a. S. legte ich in Merseburg die I. pharmazeutische Prüfung ab, konditionierte hierauf weitere 3 Jahre in deutschen und ausländischen Apotheken, bezog sodann im Wintersemester 1905/06 die Universität Leipzig und bestand daselbst im Mai 1907 die pharmazeutische Staatsprüfung mit Note I. Nach Vorbereitung zur Reifeprüfung unterzog ich mich dieser als Extraneus am Gymnasium zu Mühlhausen (Thür.), erlangte dort im September 1909 das Reifezeugnis und bezog hierauf wiederum die Universität Leipzig, an der ich 1913 das für Chemiker vorgeschriebene Verbandsexamen ablegte.